F 11

annales de technologie agricole

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE
5 DEC. 1972
DOCUMENTATION
VERSAILLES

Trimestriel

1972

Vol. 21 . N° 1

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Ann. Technol. agric. ATAPAA21 (1) 5-93 (1972).

annales de technologie agricole

Trimestriel

1972

Vol. 21 . N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1972

P. Bellenger, B. Godon. — Étude préliminaire de la « maturation » des farines de blé. Influence de l'aération sur l'évolution de diverses caractéristiques biochimiques et physicochimiques 145

P. Bénard, C. Flanzy, M. Bourzeix, S. Aubert, P. Ferry. — Méthode de vinification par macération carbonique. VII. — Influence de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité des Vins Doux Naturels élaborés à partir de *Grenache* noir..... 35

A. Bourdet, Renée Berrier, J.-C. Autran. — Critères industriels et critères de sélection pour apprécier la valeur d'utilisation des blés tendres 163

C. Divies. — Cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par *A. mexoxydans*..... 5

M. Feuillat, M. Demaimay. — Séparation des acides aminés du moût de raisin par filtration sur gel de dextrane réticulé (« Sephadex ») et analyse qualitative par chromatographie en phase gazeuse..... 131

P. Feillet, K. Kobrehel. — Recherche et dosage des produits de blé tendre dans les pâtes alimentaires par électrophorèse des protéines solubles 17

C. Jouret, J.-L. Puech. — Composition de la cire cuticulaire de la prune d'Ente 25

J. Mourgues, J. Maugenet. — Étude de laboratoire sur les possibilités d'épuration des vinasses des distilleries vinicoles par le charbon actif et par la chaux 183

A. Parfait, M. Namory, P. Dubois. — Les esters éthyliques des acides gras supérieurs des rhums..... 199

Jeanne Poisson, B. Cahagnier. — Aspect microbiologique de la conservation du maïs-grain humide par l'acide propionique..... 99

C. Poux, Andrée Ournac. — Détermination de la peroxydase dans le raisin 47

S. I. Yankov. — Oxydation des substances polyphénoliques des cerises au cours du broyage..... 123

13e Symposium international : Paris 14-16 février 1972. Commission internationale des Industries agricoles et alimentaires. Emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires.

R. Ammon. — Allocution inaugurale..... 219

D. Bertrand. — Rapport général..... 651

B. Biehl. — Enzymologische und Cytologische Probleme der Kakaoaufbereitung (Problèmes enzymologiques et cytologiques dans la préparation du cacao) 435
C. Cheftel. — Solubilisation enzymatique continue du concentré protéique de Poisson. Essai de recyclage des enzymes 423
J. de Clerck. — La stabilisation de la bière par l'addition d'enzymes protéolytiques 335
J.-É. Courtois. — Évolution et perspectives nouvelles de l'emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaire 221
R. Delecourt. — Emploi des enzymes en glucoserie 267
R. Drapron. — Réactions enzymatiques en milieu peu hydraté 487
R. Engst, H. J. Lewerenz. — Beitrag zu Hygienisch-Toxikologischen Beurteilung der Enzymanwendung (Contribution à l'appréciation des aspects hygiéniques et toxicologiques de l'emploi des enzymes) 619
A. Fricker. — Enzymatische Veränderungen in der Tiefkühlkost (Changements enzymatiques dans les aliments congelés) 501
P.-E. Fournier. — Toxicologie des enzymes (pureté-mycotoxicoses) 607
J.-F. de la Guérivière. — Utilisation d'amylases en panification fine et de protéases en biscuiterie sèche 253
A. Guilbot. — Emploi des enzymes dans les industries de cuisson des produits à base de céréales 237
M. Henry. — Enzymes et tendreté des viandes 385
J. Holló, E. Laszló, M. Tóth. — Aspects scientifiques et techniques fondamentaux du brassage enyzmatique 297
P. J. de Koning. — The replacement of calf rennet by microbial and other proteolytic enzymes during the clotting of milk. (Remplacement de la présure de veau par des enzymes protéolytiques microbiennes et autres durant la coagulation du lait) 357
G. Marteau. — L'emploi des enzymes en œnologie 567
F. Meuser. — Metabolitische Austauschreaktionen von Enzymen und Insektiziden während der Getreidelagerung. (Réactions d'échanges métaboliques entre enzymes et insecticides au cours du stockage des céréales) 515
P. Monsan, G. Durand — Utilisation en continu d'invertase fixée sur supports solides. Possibilités d'application aux industries agricoles et alimentaires 555
H. Noilhan. — L'emploi des enzymes du point de vue de la législation française 647
Ch. C. J. Olling. — Lactase. — Treatment in the dairy industry (La lactase, son emploi dans l'industrie laitière) 343
A. Purr. — Enzymatische Vorgänge in Kakaobohnen während der Fermentation bei Anwendung der Vakuuminfiltration (Effets du traitement des fèves fraîches de cacao par infiltration sous vide de certaines substances) 457
B. J. Radola, H. Delincee. — The effect of ionizing radiation on enzymes (Effets des radiations ionisantes sur les enzymes) 473

Dr. Rehkaemper. — Anwendbarkeit enzymatischer Analysen-methoden in der Lebensmittelchemie (Application de méthodes enzymatiques pour l'analyse alimentaire) 629

D. Reymond, D. A. Bush. — Les pectinetranséliminases et leurs possibilités d'application en technologie des jus de fruits 545

O. T. Rotini, P. Sequi. — Recherches sur l'enzyme coagulante de l'*Endothia parasitica* 367

A. Ruiter. — Substitution of proteases in the enzymic ripening of herring (substitution des protéases à la maturation enzymatique du Hareng) 597

H. Ruttloff. — Zur Charakterisierung von Glucoamylase (Determination des caractéristiques de la glucoamylase) 287

Wieslaw Rzedowski. — Utilisation des enzymes dans l'industrie de fruits et légumes 535

D. Tzakov, As. Velitchkov. — Emploi des préparations enzymatiques pectolytiques et de cellulase dans la production des vins 589

A. J. Wieg. — Die Technologie der Bierherstellung mit Rohfrucht und Industriellen Enzympräparaten. (Technologie du brassage avec des grains crus et des préparations enzymatiques industrielles) 321

Laurence I. Wood, Esq., Stephen A. Weitzman, Esq. Kennedy and Leighton — Regulation of enzymes (Législation concernant l'emploi des enzymes dans les industries alimentaires) 635

Notes.

C. Jouret, M. Moutounet, P. Dubois. — Formation du vinylbenzène lors de la fermentation alcoolique du raisin 69

J. Maugenet, Maria-Halina Lipiec, Marie-Laure Dalmeyda. — Détermination de la méthionine dans les levures par hydrolyse alcaline et colorimétrie spécifique 73

Mise au point bibliographique.

J.-C. Pech, J. Fallot. — Les enzymes et la qualité des pêches 81

CONTENTS

P. Bellenger, B. Godon. — Preliminary study on the maturation of wheat flours. Influence of aeration upon the evolution of various biochemical and physico-chemical characteristics 145

P. Bénard, C. Flanzy, M. Bourzeix, S. Aubert, P. Ferry. — Wine-making by carbonic maceration. VII. — Influence of temperature and duration of carbonic maceration on the quality of fortified french wines (« Vins Doux Naturels ») prepared from black *Grenache* 35

A. Bourdet, Renée Berrier, J.-C. Autran. — Industrial and breeding criteria used for assessing the baking quality of soft wheats 163

C. Divies. — Kinetic of the oxidation of ethanol and acetaldehyde by *A. mesoxydans* 5

M. Feuillat, M. Demaimay. — Separation of the aminoacids of grape must by filtration on reticulated dextrane gel (« Sephadex ») and qualitative analysis by gas-liquid chromatography 131

P. Feillet, K. Kobrehel. — Detection and estimation of common wheat in pasta products by electrophoresis of soluble proteins 17

C. Jouret, J.-L. Puech. — Composition of the cuticular was of plums (variety « d'Ente ») 25

J. Mourgues, J. Maugenet. — Laboratory study on the treatment of the wine distilleries wastes by activated carbon and by lime 183

A. Parfait, M. Namory, P. Dubois. — Ethyl esters of the rum higher fatty acids 199

Jeanne Poisson, B. Cahagnier. — Microbiological aspect of preserving moist maize grains by propionic acid 99

C. Poux, Andrée Ournac. — Determination of peroxydase in grapes 47

S. I. Yankov. — Oxydation of polyphenolic substances of cherries during crushing 123

13th International Symposium, Paris, 14th to 16th February 1972. Commission internationale des industries agricoles et alimentaires. « Use of enzymes in agricultural and food industries »

R. Ammon. — Opening speech 219

D. Bertrand. — General report 651

B. Biehl. — Enzymological and cytological problems in cocoa preparation.. 435

C. Cheftel. — Continous enzymatic solubilization of fish protein concentrate : enzyme recyeling studies 423

J. de Clerck. — Enzymes andthe stabilization of beers 335

J.-É. Courtois. — Evolution and new perspectives of use of enzymes in the agricultural and food industries 221

R. Delecourt. — Enzymes in glucose manufacture 267

R. Drapron. — Enzymatic reactions in systems with low water contents..... 487

R. Engst, H. J. Lewerenz. — Contribution to the appreciation of sanitary and toxicological aspects of the use of enzymes 619

A. Fricker. — Enzymatic changes in frozen foods 501

P.-E. Fournier. — The purity of enzymatic preparations ; micotoxins 607

J.-F. de la Guérivière. — The use of amylases in fine bread-making, and proteases in the dry biscuit trade 253

A. Guilbot. — Use of enzymes in cereal products baking industries 237

M. Henry. — Enzymes and tenderness of meat 385

J. Holló, É. Laszló, M. Tóth. — Theoretical aspects of brewing 297

P.-J. de Koning. — The replacement of calf rennet by microbial and other proteolytic enzymes during the clotting of milk 357

G. Marteau. — Utilization of enzymes in oenology 567

F. Meuser. — Reactions of metabolic exchanges between enzymes and insecticides during the stocking of cereals 515
P. Monsan, G. Durand. — The use of enzymes fixed on solid supports in the preparation of beverages 555
H. Noilhan. — Use of enzymes and the french regulation 647
Ch. C. J. Olling. — Lactase. — Treatment in the dairy industry 343
A. Purr. — Enzymatic processes in cacao beans during fermentation under vacuum infiltration 457
B. J. Radola, H. Delincee. — The effect of ionizing radiation on enzymes ... 473
Dr. Rehkaemper. — Applicability of enzymic methodes in the chemistry of foodstuffs 629
D. Reymond, D. A. Bush. — Pectin-transeliminases and their possible uses in the technology of fruit juces 545
O. T. Rotini, P. Sequi. — Studies on milk-clotting enzyme of *Endothia parasitica* 367
A. Ruiter. — Substitution of proteases in the enzymic ripening of Herring 597
H. Ruttloff. — Characterization of glucoamylase 287
Wieslaw Rzedowski. — Use of enzyms in fruit and vegetable industries 535
D. Tzakov, As. Velitchkov. — Contribution to the study on the effect of pectolytic enzymatic preparations and preparations of cellulase in wine production 589
A. J. Wieg. — The technology of brewing with adjuncts and industrial enzyme preparations 321
Laurence I. Wood, Esq. and Stephen A. Weitzman. Esq. Kennedy and Leighton — Regulation ofenzymes 635

Notes.

C. Jouret, M. Moutounet, P. Dubois. — Production of vinylbenzene during the alcoholic fermentation of grapes 69
J. Maugenet, Maria-Halina Lipiec, Marie-Laure Dalmeyda. — A colorimetric determination of the methionine content of yeasts 73

Review.

J.-C. Pech, J. Fallot. — Enzymes and quality of peaches 81

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 5-16.

CINÉTIQUE D'OXYDATION DE L'ÉTHANOL ET DE L'ACÉTALDÉHYDE PAR *ACETOBACTER MESOXYDANS*

C. DIVIES

avec la collaboration technique de C. SCHNEIDER

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches I. N. R. A.,
21034 Dijon Cedex

RÉSUMÉ

L'auteur examine la cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par les cellules entières et les enzymes particulaires d'*A. mesoxydans* isolé dans un fermenteur submergé de vinaigrerie.

Sur les cellules entières, l'oxydation de l'éthanol en fonction de sa concentration montre une cinétique avec deux constantes apparentes, $Km_1 = 2{,}8 \cdot 10^{-3}$ M et $Km_2 = 3{,}9 \cdot 10^{-2}$ M. Cette cinétique est retrouvée sur les enzymes particulaires. L'acide acétique est un inhibiteur compétitif de l'éthanol ; il intervient sous sa forme non dissociée ; de plus il entre en compétition avec les ions H^+ du milieu. L'inhibition par l'acide acétique est beaucoup plus élevée sur les enzymes particulaires que sur les cellules entières.

L'oxydation de l'acétaldéhyde par les enzymes particulaires montre deux constantes apparentes ; l'acide acétique n'inhibe pas de façon compétitive son oxydation.

La mesure des constantes apparentes pour l'oxygène montre que la réaction acétaldéhyde — acide acétique est arrêtée avant la réaction éthanol — acétaldéhyde lorsque le milieu s'appauvrit progressivement en oxygène.

Mots clés : *Acetobacter, cinétique d'oxydation, enzymes particulaires, éthanol, acétaldéhyde, acide acétique.*

I. — INTRODUCTION

Il est courant d'observer que la fermentation acétique se ralentit au fur et à mesure que l'acide acétique s'accumule dans le milieu ; l'acide acétique produit apparaît en quelque sorte comme un inhibiteur de l'oxydation de l'éthanol (CONNER *et al.*, 1959).

Nous avons nous-même constaté que lorsque la croissance des bactéries s'arrête par suite de l'accumulation de l'acide acétique, le nombre des cellules capables de se multiplier diminue en l'espace de quelques heures. L'inhibition de l'oxydation est-elle due simplement à la « mort » des cellules ou bien l'acide acétique lui-même inhibe-t-il l'oxydation de l'éthanol ?

Nous savons d'autre part que l'oxydation de l'éthanol est effectuée chez les bactéries acétiques par deux types d'enzymes différentes : enzymes particulaires et enzymes solubles (Dupuy et Maugenet 1962) et qu'il faut considérer l'oxydation de l'éthanol par les enzymes particulaires comme la succession de deux réactions catalysées par une éthanol-déshydrogénase et une acétaldéhyde-déshydrogénase (Divies et Dupuy, 1970). C'est pourquoi nous avons comparé la cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde des cellules entières et des enzymes particulaires en l'absence et en présence d'acide acétique. Enfin, il est courant d'observer, au cours des arrêts de fermentation par manque d'oxygène, une forte odeur d'acétaldéhyde ; nous avons donc mesuré le Km (O_2) pour les deux substrats.

II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

Nous avons réalisé cette étude avec une souche d'*Acetobacter mesoxydans* isolée dans le fermenteur d'une vinaigrerie et que nous avons identifiée selon la classification proposée par Frateur (1950). On observe que les colonies obtenues sur milieu gélosé G_2 (Maugenet, 1962) présentent un aspect granuleux. La souche est conservée sur ce même milieu G_2.

Le milieu de culture stérilisé 20 minutes à 110°C a la composition suivante :

Extrait de levure (Difco)	1 g
Extrait de bœuf (Difco)	1 g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,3 g
$MgSO_4$, 7 H_2O	0,024 g
Tampon phosphate 0,2 M ; pH 4,5	100 ml
Solution de sels minéraux de Skeggs et Wright (Divies, 1970)	5 ml
Glucose	2 g
Éthanol à 95°GL	40 ml
Acide acétique	5 ml
Eau q.s.p.	1 l

Les substrats carbonés éthanol et acide acétique qui sont déjà stériles sous forme commerciale sont ajoutés après stérilisation.

Une préculture de 24 heures est réalisée dans les conditions décrites par Divies et Dupuy (1969) avant l'ensemencement d'un fermenteur de 1,5 l, maintenu à 28°C ; le coefficient d'oxygénation, dans les conditions de l'expérience, est de 130 mmoles O_2 par litre et par heure. La récolte des cellules et la préparation des cellules non proliférantes sont identiques à celles utilisées par Divies et Dupuy (1969).

La préparation des éthanol et acétaldéhyde-déshydrogénases particulaires, ou enzymes insolubles, est faite selon la méthode de Kersters et De Ley (1966).

La respiration des cellules ainsi que les mesures d'activité des éthanol et acétaldéhyde-déshydrogénases particulaires ont été effectuées selon la méthode manométrique de Warburg, à 25°C en ce qui concerne l'acétaldéhyde, et à 30°C pour l'éthanol. Pour toutes nos expériences nous avons choisi d'utiliser le tampon phosphate 0,2 M dont le pH est déterminé par mélange d'H_3PO_4, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4. Dans certaines zones de pH les mélanges de phosphates utilisés n'ont pas de bon pouvoir tampon ; aussi avons nous vérifié que le pH restait bien constant au cours des mesures. Les solutions d'acide acétique utilisées ont été portées préalablement au pH de l'expérience. Afin qu'il ne subsiste aucune ambiguïté au cours de la lecture du texte, nous précisons que nous nommons acide acétique la somme des formes dissociée et non dissociée de l'acide acétique ; le terme acétate est réservé à l'ion CH_3-COO^-. La préparation de l'atmosphère des manomètres pour la mesure des Km (O_2) a été faite en faisant circuler 2 litres de gaz contenant différentes teneurs d'oxygène et d'azote.

Les mesures des activités éthanol et acétaldéhyde-déshydrogénases particulaires ont été aussi effectuées en suivant la diminution de densité optique à 400 nm du ferricyanure, selon les indications de NAKAYAMA (1961).

Nous avons vérifié la concentration des solutions d'acétaldéhyde et d'éthanol utilisées en oxydant des quantités limitantes de ces substrats par les enzymes particulaires.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. — *Oxydation de l'éthanol*

a) *Cellules non proliférantes*

Nous constatons (fig. 1) une cinétique différente dans l'oxydation de l'éthanol pour les intervalles de concentration $0{,}425 \cdot 10^{-3}$ M à $42{,}5 \cdot 10^{-3}$ M et $122 \cdot 10^{-3}$ M à

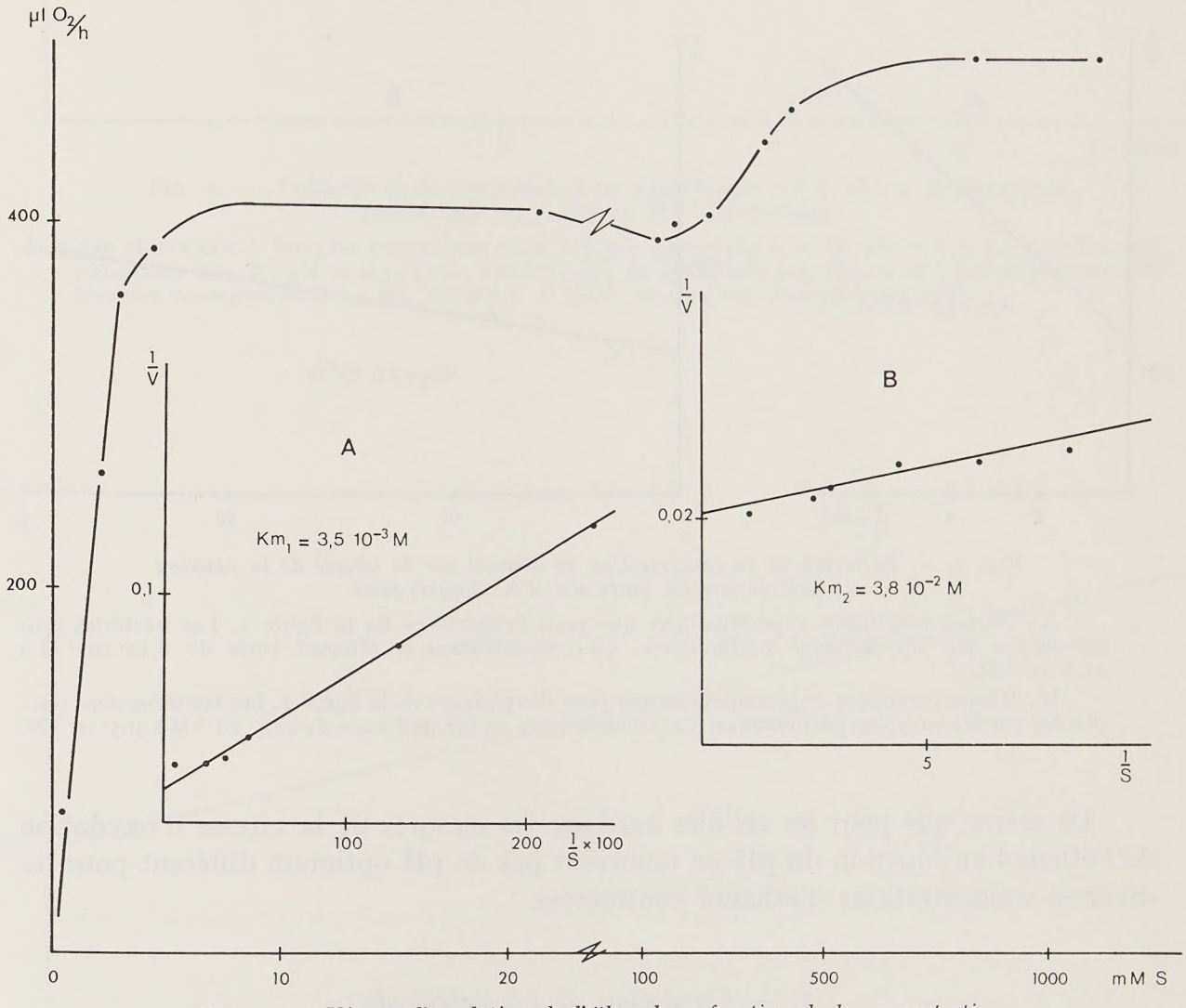


FIG. 1. — *Vitesse d'oxydation de l'éthanol en fonction de la concentration par les cellules non proliférantes d'*A. mesoxydans

Respiration mesurée par la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°C. Mélange réactionnel : bactéries 0,5 ml à la concentration de 0,386 mg/ml ; éthanol (S) 0,5 ml à différentes concentrations ; tampon phosphate 0,2 M, pH = 3,2, 1 ml.

A l'intérieur : A : représentation des données de la figure 1 selon LINEWEAVER et BURK pour les concentrations de l'éthanol (S) allant de $0{,}425 \cdot 10^{-3}$ M à $42{,}5 \cdot 10^{-3}$ M.

B : représentation des données de la figure 1 selon LINEWEAVER et BURK pour les concentrations de l'éthanol (S) allant de $122 \cdot 10^{-3}$M à $820 \cdot 10^{-3}$M.

$820 \cdot 10^{-3}$ M. Les constantes apparentes mesurées graphiquement sont respectivement de $3,5 \cdot 10^{-3}$ M et $3,8 \cdot 10^{-2}$ M.

Les mesures effectuées entre les pH 2,5 et 7,5 pour des concentrations d'éthanol prises dans les deux intervalles présentant une cinétique différente, ne nous ont pas permis de montrer l'existence de pH optimum différent pour les concentrations considérées.

b) *Enzymes particulaires.*

On observe (fig. 2) deux cinétiques différentes dans l'oxydation de l'éthanol. A pH = 3,7, pour les intervalles de concentration $2,12 \cdot 10^{-3}$ M à $21,2 \cdot 10^{-3}$ M et $42,5 \cdot 10^{-3}$ M à $365 \cdot 10^{-3}$ M, les constantes apparentes sont respectivement : $Km_1 = 2,5 \cdot 10^{-3}$M et $Km_2 = 2,5 \cdot 10^{-2}$ M.

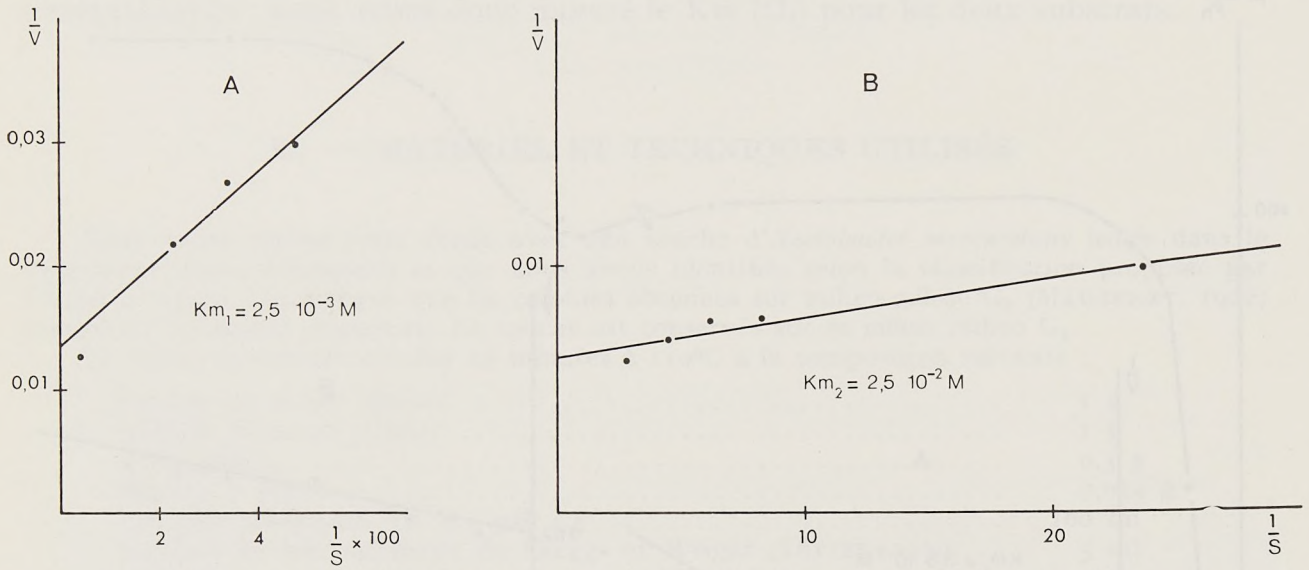


FIG. 2. — *Influence de la concentration en éthanol sur la vitesse de la réaction réalisée par les particules d'*A. mesoxydans

A : Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 1. Les bactéries sont remplacées par les enzymes particulaires. La concentration en éthanol varie de $2,12 \cdot 10^{-3}$ M à $21,2 \cdot 10^{-3}$ M.

B : Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 1. Les bactéries sont remplacées par les enzymes particulaires. La concentration en éthanol varie de $42,5 \cdot 10^{-3}$ M à $365 \cdot 10^{-3}$ M.

De même que pour les cellules entières, les mesures de la vitesse d'oxydation de l'éthanol en fonction du pH ne montrent pas de pH optimum différent pour les diverses concentrations d'éthanol considérées.

2. — *Oxydation de l'acétaldéhyde*

De même que pour l'oxydation de l'éthanol, on observe pour l'oxydation de l'acétaldéhyde par les enzymes particulaires (fig. 3) deux cinétiques différentes suivant la concentration $Km_1 = 9 \cdot 10^{-5}$ M et $Km_2 = 1,8 \cdot 10^{-3}$ M. Pour les fortes concentrations d'acétaldéhyde (fig. 4) supérieures à 10 mM/l, nous constatons une inhibition par le substrat, $Ki = 0,203$ M.

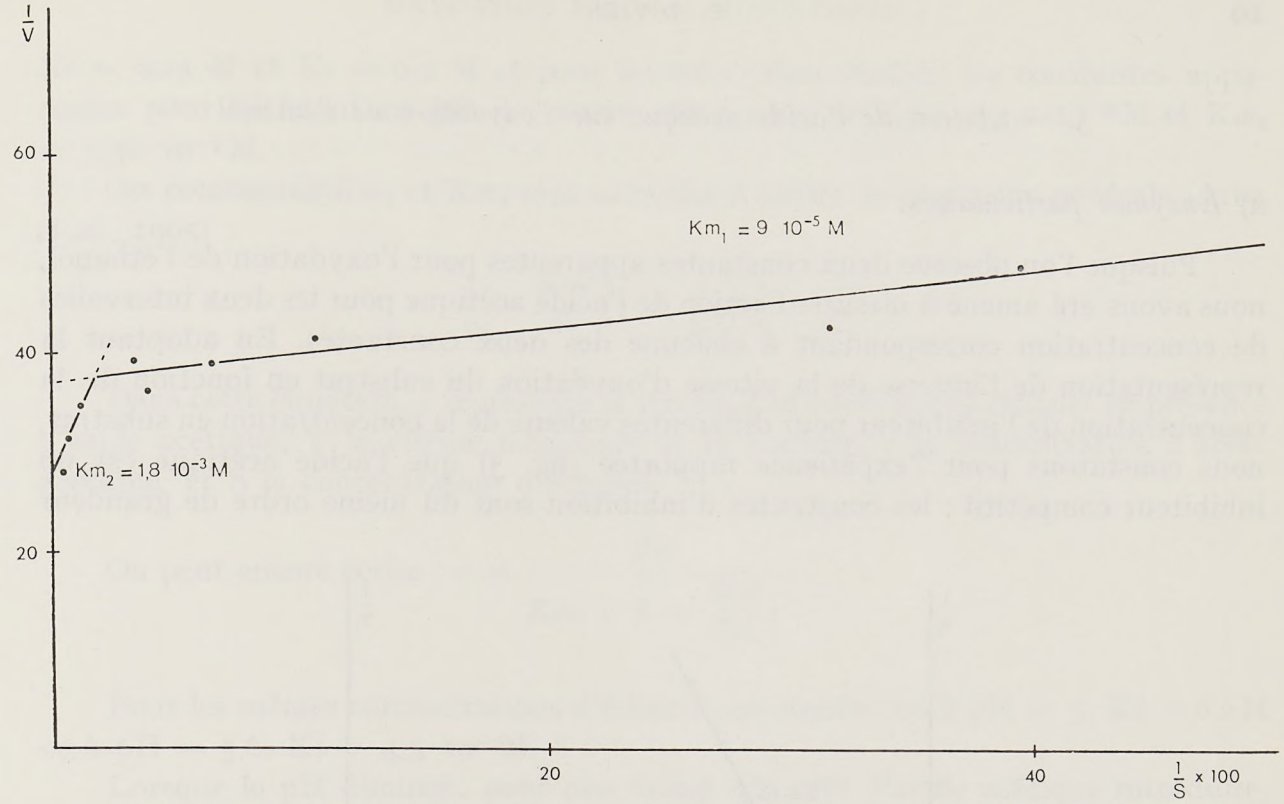


FIG. 3. — *Influence de la concentration en acétaldéhyde sur la vitesse de la réaction réalisée par les particules d'*A. mesoxydans

Mélange réactionnel : Enzyme particulaire dans tampon phosphate 0,01 M, pH = 6,5, 0,3 ml ; Tampon phosphate 0,04 M, pH = 6,5, 3 ml ; Ferricyanure de potassium 0,02 M, 0,1 ml ; Acétaldéhyde à différentes concentrations 0,1 ml. Vitesse V = ΔDO 400 nm/mn. Température 25°C.

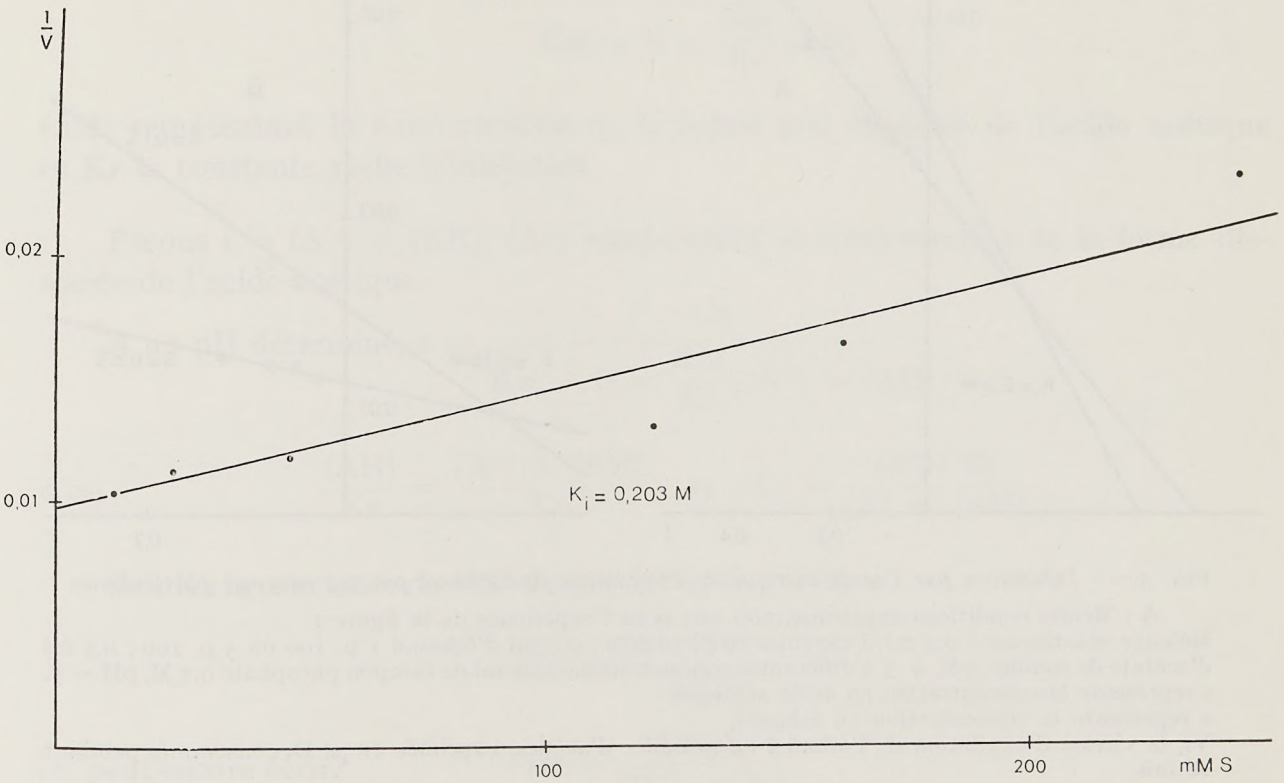


FIG. 4. — *Mesure de l'inhibition provoquée par des fortes concentrations d'acétaldéhyde sur sa propre oxydation réalisée par les enzymes particulaires*

Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 1. Température 25°C.
S représente la concentration d'acétaldéhyde, V la vitesse d'oxydation de l'acétaldéhyde exprimée en μl O_2 consommés pendant 5 mn.

3. — *Action de l'acide acétique sur l'oxydation de l'éthanol*

a) *Enzymes particulaires.*

Puisque l'on observe deux constantes apparentes pour l'oxydation de l'éthanol, nous avons été amené à mesurer l'action de l'acide acétique pour les deux intervalles de concentration correspondant à chacune des deux constantes. En adoptant la représentation de l'inverse de la vitesse d'oxydation du substrat en fonction de la concentration de l'inhibiteur pour différentes valeurs de la concentration en substrat, nous constatons pour l'expérience rapportée (fig. 5) que l'acide acétique est un inhibiteur compétitif ; les constantes d'inhibition sont du même ordre de grandeur

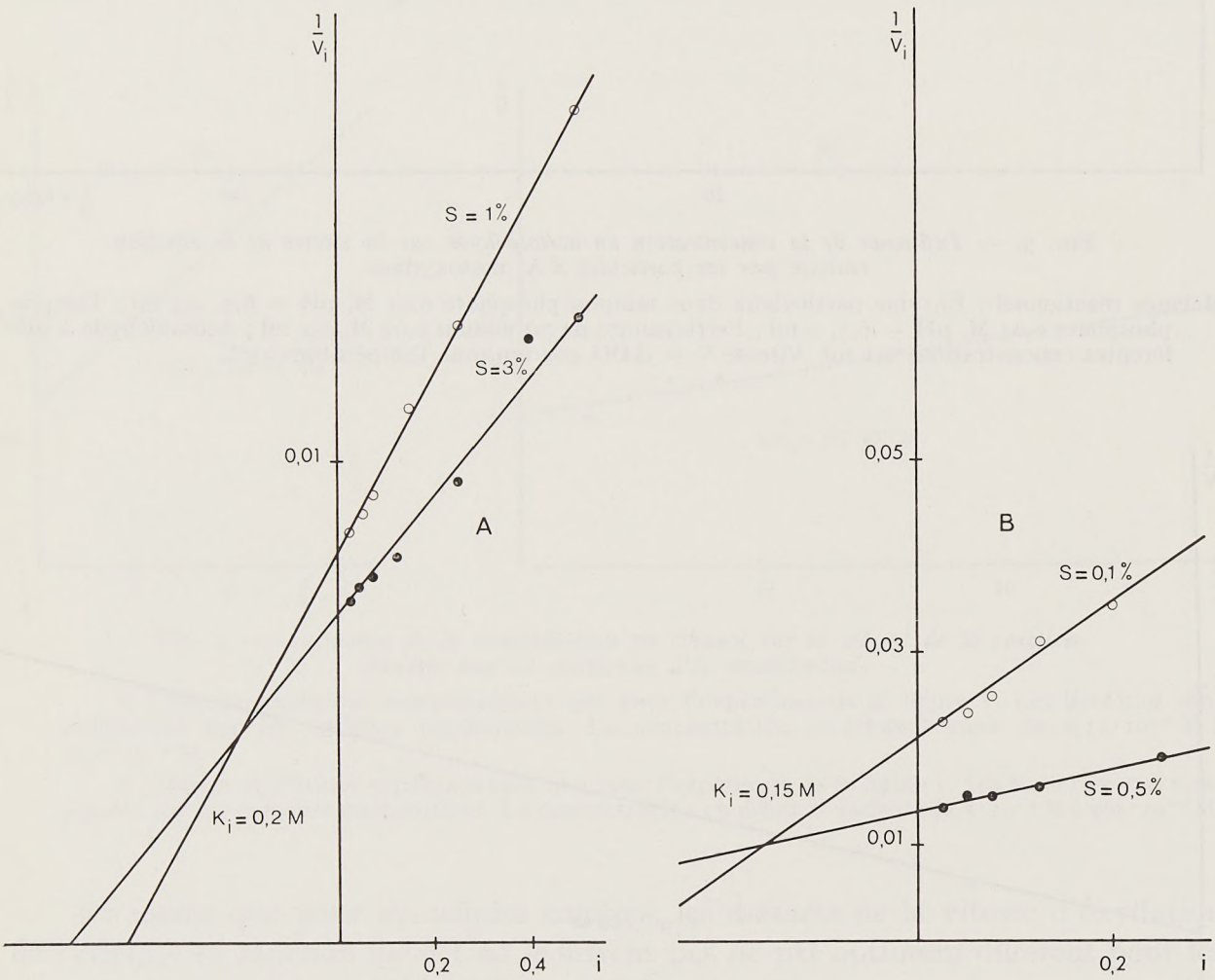


FIG. 5. — *Inhibition par l'acide acétique de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes particulaires*

A : Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 1.
Mélange réactionnel : 0,4 ml d'enzymes particulaires ; 0,5 ml d'éthanol 1 p. 100 ou 3 p. 100 ; 0,5 ml d'acétate de sodium, pH = 5 à différentes concentrations ; 0,6 ml de tampon phosphate 0,2 M, pH = 5.
i représente la concentration en acide acétique,
s représente la concentration en éthanol,
Vi, la vitesse d'oxydation de l'éthanol en présence d'acétate exprimée en µl O_2 consommés pendant 20 mn.

B : Conditions expérimentales identiques à celles de la figure 5 A. Seules les concentrations d'éthanol ont été changées.
Vi représente la vitesse d'oxydation de l'éthanol en présence d'acétate exprimée en µl O_2 consommés pendant 35 mn.
Le mélange réactionnel contient 0,6 ml d'enzymes particulaires.

$Ki = 0{,}15$ M et $Ki = 0{,}2$ M et pour les intervalles étudiés, les constantes apparentes pour l'éthanol au pH de mesure de 5 sont de $Km_1 = 4{,}1 \cdot 10^{-3}$ M et $Km_2 = 3{,}32 \cdot 10^{-2}$ M.

Ces constantes Km_1 et Km_2 sont calculées à partir de l'équation générale (Aiba *et al.*, 1965) :

$$\frac{1}{v} = \frac{Km}{V}\left(1 + \frac{i}{Ki}\right)\frac{1}{S} + \frac{1}{V}.$$

Dans cette équation, v représente la vitesse d'oxydation de l'éthanol en présence d'acide acétique, V la vitesse maximale de la réaction, i la concentration d'acide acétique, et S la concentration d'éthanol.

On peut encore écrire : $v = \dfrac{VS}{Km + S + \dfrac{Km}{Ki}\,i}$.

Pour les mêmes concentrations d'éthanol, on observe qu'à pH = 5, $Ki = 0{,}2$ M et à pH = 3,6, $Ki = 4{,}5 \cdot 10^{-3}$M.

Lorsque le pH diminue, pour une même quantité d'acide acétique introduite, on observe donc que l'inhibition augmente. L'acide acétique non dissocié est-il responsable de cette inhibition ?

Si l'acide acétique non dissocié est l'inhibiteur responsable, on doit avoir (quel que soit le pH) :

$$v = \frac{VS}{Km + S + \dfrac{Km}{Kr}(AH)}$$

(AH) représentant la concentration de la forme non dissociée de l'acide acétique et Kr la constante réelle d'inhibition.

Posons $i = (A^-) + (AH)$, (A^-) représentant la concentration de la forme dissociée de l'acide acétique.

A un pH déterminé, $v = \dfrac{VS}{Km + S + \dfrac{Km}{Ki}[(A^-) + (AH)]}$

d'où $\dfrac{(AH)}{Kr} = \dfrac{(A^-) + (AH)}{Ki}$ et $Kr = \dfrac{(AH)\,Ki}{(A) + (AH)}$.

Soit Ka la constante de dissociation de l'acide acétique.

$$Ka = \frac{(A^-)\,(H^+)}{(AH)};$$

on peut encore écrire $Kr = \dfrac{(H^+)\,Ki}{(H^+) + Ka}$.

Tenant compte de ces transformations, on obtient, en choisissant $Ka = 1{,}4 \cdot 10^{-5}$ M (Truchet, 1948) : à pH = 3,6, $Kr = 4{,}25 \cdot 10^{-2}$ M et à pH = 5, $Kr = 8{,}35 \cdot 10^{-2}$ M.

Nous observons enfin (fig. 6, courbes 1 et 2) la similitude entre le pourcentage d'acide acétique non dissocié et le pourcentage d'inhibition.

Le rapport des vitesses d'oxydation de l'éthanol, en absence et en présence d'acide acétique, en fonction de la teneur en acide acétique non dissocié et selon

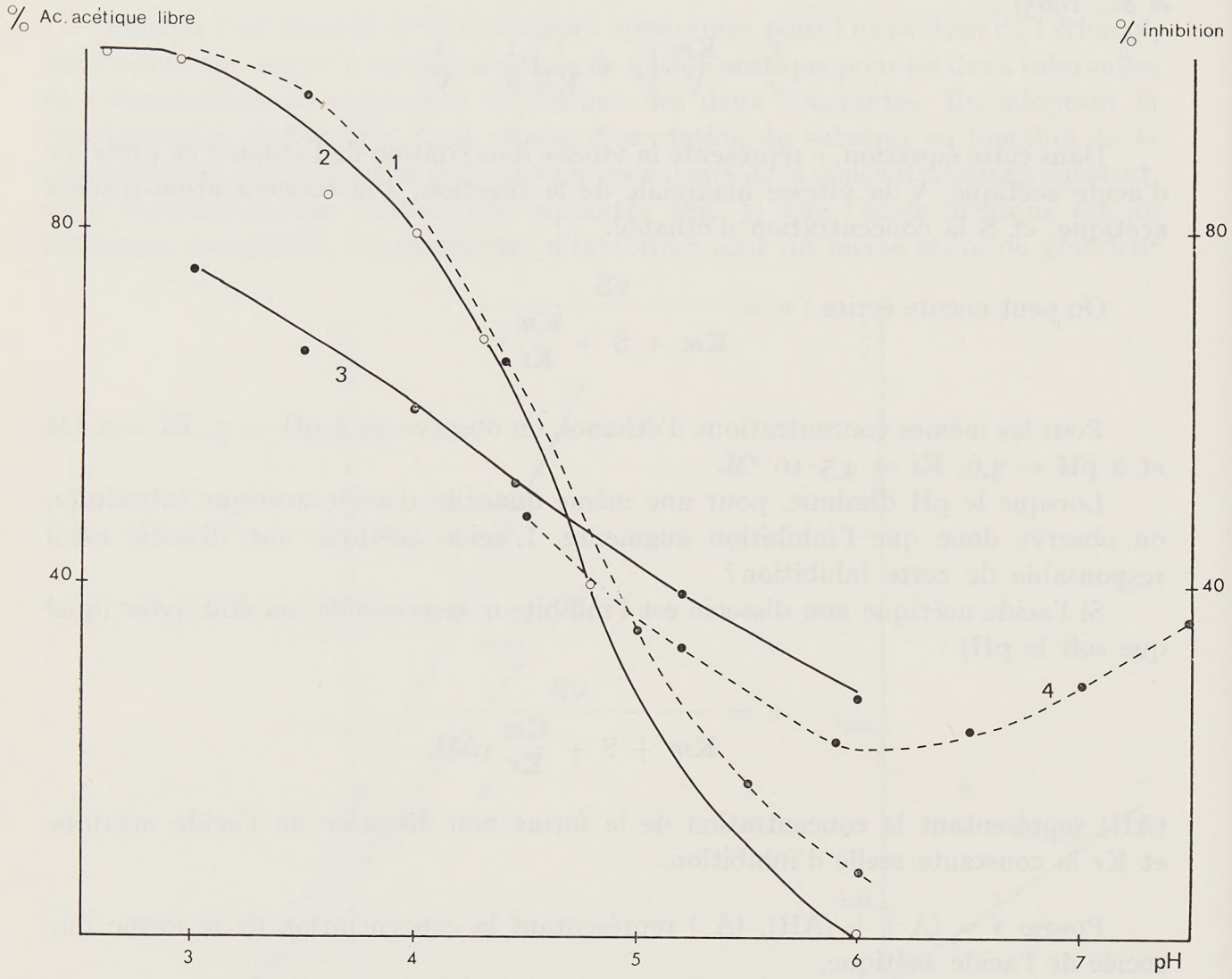


FIG. 6. — *Inhibition de l'oxydation de l'éthanol en fonction du pH pour une même concentration d'acide acétique*

Courbe 1 : pourcentage d'acide acétique non dissocié.
Courbe 2 : pourcentage de l'inhibition de l'oxydation par les enzymes particulaires.
Courbes 3 et 4 : pourcentage de l'inhibition de l'oxydation par les cellules non proliférantes.
La concentration d'éthanol à chaque pH est de $42{,}5 \cdot 10^{-3}$ M et la concentration d'acide acétique est de 0,75M.
Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la figure 5A.

le pH de la réaction, est représenté dans la fig. 7. Nous constatons que l'acide acétique non dissocié se comporte aussi comme inhibiteur compétitif vis-à-vis des ions H^+ ; rappelons que DUPUY (1958) avait montré que les ions H^+ étaient des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de l'éthanol.

b) *Cellules non proliférantes.*

Les mesures effectuées sur les cellules entières montrent de même que l'acide acétique est un inhibiteur compétitif pour l'oxydation de l'éthanol ; cependant, à pH = 3,6, une concentration de 0,025 M entraîne une inhibition de 6 p. 100, alors

que sur les enzymes particulaires cette inhibition est de 26,5 p. 100. Le K*i* passe de $4{,}5 \cdot 10^{-2}$M à $2 \cdot 10^{-1}$M. De plus, en portant en fonction du pH le pourcentage d'inhibition pour une même quantité d'acide acétique introduite, nous observons à la différence des enzymes particulaires une inhibition minimale à pH = 6 (fig. 6, courbe 4).

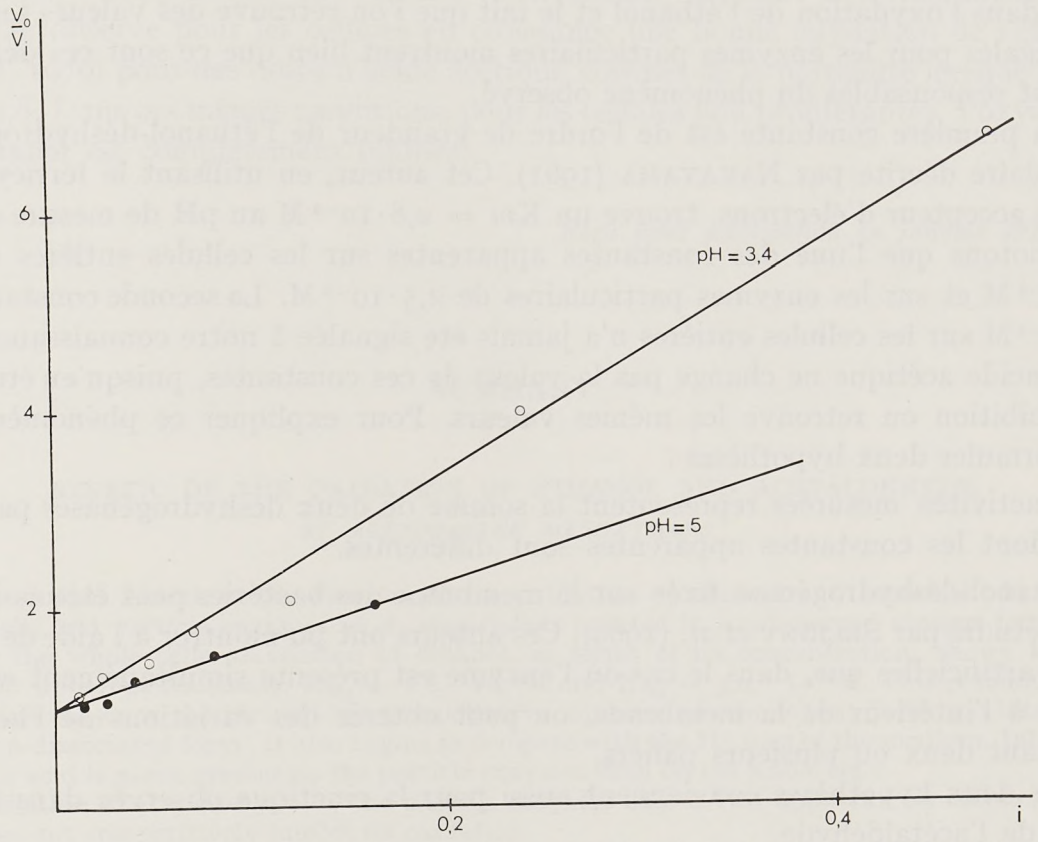


FIG. 7. — *Inhibition par l'acide acétique non dissocié de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes particulaires*

Vo : vitesse d'oxydation sans inhibition.
V*i* : vitesse d'oxydation en présence d'acide acétique.
i : représente la concentration en acide acétique non dissocié.
Les pH de la réaction sont de 3,4 et 5.
Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour l'expérience de la figure 5 A.

4. — *Action de l'acide acétique sur l'oxydation de l'acétaldéhyde*

L'action de l'acide acétique est moins prononcée sur l'acétaldéhyde-déshydrogénase particulaire que sur l'éthanol-déshydrogénase particulaire ; ainsi, à pH = 3,6, 0,75 M d'acide acétique entraîne une inhibition de 57 p. 100, alors que cette inhibition est de 86 p. 100 sur l'éthanol-déshydrogénase particulaire. L'inhibition observée est indépendante de la concentration d'acétaldéhyde ; il ne s'agit donc pas d'une inhibition de type compétitif comme pour l'éthanol.

5. — *Action de la teneur en oxygène sur l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde*

Les mesures effectuées sur les enzymes particulaires à pH = 3,5 par la méthode manométrique de Warburg ont donné pour l'éthanol $Km(O_2) = 15{,}6 \cdot 10^{-6}$ M et pour l'acétaldéhyde $83{,}5 \cdot 10^{-6}$M.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

L'observation sur les cellules entières de deux constantes enzymatiques différentes dans l'oxydation de l'éthanol et le fait que l'on retrouve des valeurs sensiblement égales pour les enzymes particulaires montrent bien que ce sont ces dernières qui sont responsables du phénomène observé.

La première constante est de l'ordre de grandeur de l'éthanol-déshydrogénase particulaire décrite par NAKAYAMA (1961). Cet auteur, en utilisant le ferricyanure comme accepteur d'électrons, trouve un $Km = 2{,}8 \cdot 10^{-3}$ M au pH de mesure de 3,8. Nous notons que l'une des constantes apparentes sur les cellules entières est de $3{,}5 \cdot 10^{-3}$ M et sur les enzymes particulaires de $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M. La seconde constante de $3{,}9 \cdot 10^{-2}$ M sur les cellules entières n'a jamais été signalée à notre connaissance.

L'acide acétique ne change pas la valeur de ces constantes, puisqu'en étudiant son inhibition on retrouve les mêmes valeurs. Pour expliquer ce phénomène, on peut formuler deux hypothèses :

a) les activités mesurées représentent la somme de deux déshydrogénases particulaires dont les constantes apparentes sont différentes.

b) l'éthanol-déshydrogénase fixée sur la membrane des bactéries peut être assimilée au cas étudié par SELIGNY *et al.* (1969). Ces auteurs ont pu montrer à l'aide de membranes artificielles que, dans le cas où l'enzyme est présente simultanément en surface et à l'intérieur de la membrane, on peut obtenir des variations de l'activité présentant deux ou plusieurs paliers.

Ces deux hypothèses conviennent aussi pour la cinétique observée dans l'oxydation de l'acétaldéhyde.

Pour pouvoir choisir entre ces deux hypothèses, il faut entreprendre d'autres recherches, notamment isoler l'enzyme ou les deux enzymes responsables.

Lorsque par coupure de l'aération on arrête brusquement la fermentation acétique, il est courant de constater une accumulation d'acétaldéhyde dans le milieu de culture. Ce fait est confirmé par les mesures du $Km(O_2)$ pour l'éthanol et l'acétaldéhyde. Lorsque le milieu s'appauvrit en O_2, la réaction acétaldéhyde-acide acétique est arrêtée avant la réaction éthanol-acétaldéhyde, puisque le Km (O_2) pour l'acétaldéhyde est de $83{,}6 \cdot 10^{-6}$ M au lieu de $15{,}6 \cdot 10^{-6}$ M pour l'éthanol.

Les mesures sur les cellules non proliférantes et sur les extraits enzymatiques montrent que l'acide acétique est un inhibiteur compétitif vis-à-vis de l'éthanol et non vis-à-vis de l'acétaldéhyde. DUPUY (1958) a montré que les ions (H^+) sont des inhibiteurs compétitifs dans l'oxydation de l'éthanol ; nous constatons que les ions (H^+) entrent aussi en compétition avec l'acide acétique non dissocié pour l'inhibition dans l'oxydation de l'éthanol. MORI, KONNO, TERUI (1970) constatent que l'acide acétique augmente le Km (O_2) qui passe de $7 \cdot 10^{-7}$ M à $2{,}64 \cdot 10^{-5}$M à pH = 3,8 et de $7{,}2 \cdot 10^{-7}$ M à $1{,}95 \cdot 10^{-6}$ M à pH = 5,8. A pH = 3,8, pour une même concentration d'acide acétique, l'inhibition est plus forte. Est-ce ici encore la forme non dissociée de l'acide acétique qui participe à cette inhibition ?

L'acide acétique paraît donc intervenir à différents niveaux dans l'oxydation de l'éthanol. Il entre en compétition avec les ions (H^+), l'éthanol et avec l'oxygène.

A la différence des constantes de Michaelis obtenues pour l'éthanol, qui sont sensiblement égales sur les cellules entières et sur les enzymes particulaires, les constantes d'inhibition de l'acide acétique passent à pH = 3,6 de $4,5 \cdot 10^{-2}$ M pour les extraits cellulaires à 0,2 M pour les cellules non prolifèrantes.

On peut de même considérer que les mesures effectuées sur les cellules entières ne sont pas transposables aux cellules en croissance réalisant la fermentation acétique. On observe pour les cellules en croissance une bonne oxydation de l'éthanol (DIVIES, 1970) pour des doses d'acide acétique voisines de la normalité lorsque le pH est de 2,8. Dans ces mêmes conditions, pour les cellules non proliférantes, l'oxydation de l'éthanol est complètement inhibée.

Reçu pour publication en janvier 1972.

SUMMARY

KINETIC OF THE OXIDATION OF ETHANOL AND ACETALDEHYDE *BY ACETOBACTER MESOXYDANS*

The author examines the kinetics of the oxidation of ethanol and acetaldehyde by the whole cells and particle enzymes of *A. mesoxydans* isolated in a submerged vinegar fermenter.

On the whole cells, oxydation of ethanol, in terms of its concentration, shows kinetics with two apparent constants, $K_{m_1} = 2,8 \cdot 10^{-3}$M and $K_{m_2} = 3,9 \cdot 10^{-2}$M. This is found again on particle enzymes. Acetic acid is a competititive inhibitor of ethanol oxydation ; it intervenes in its non-dissociated form ; it also begins to compete with the H^+ ions of the medium. Inhibition by acetic acid is much greater on the particle enzymes than on the whole cells.

Oxidation of acetaldehyde by the particle enzymes shows two apparent constants ; acetic acid does not competitively inhibit its oxidation.

The measure of the apparent constants for oxygen shows that the acetaldehyde-acetic acid reaction stops before the ethanol-acetaldehyde reaction, when the medium progressively grows poor in oxygen

RESUMEN

CINETICA DE OXIDACION DEL ETANOL Y DEL ACETALDEHIDO POR *ACETOBACTER MESOXYDANS*

El autor examina la cinética de oxidación del etanol y del acetaldehido por las células enteras y las enzimas particulares de *A. mesoxidans* aislado en un fermentador sumergico de fabricación de vinagres.

Al tratarse de las células enteras, la oxidación del etanol en función de su concentración demuestra una cinética con dos constantes aparentes, $K_{m_1} = 2,8 \cdot 10^{-3}$M y $K_{m_2} = 3,9 \cdot 10^{-2}$M. Esta cinética vuelve a ser encontrada en las enzimas particulares. El ácido acético es un inhibidor competitivo del etanol oxidación e interveine en su forma no disociada. Además, entra también en competición con los iones H^+ del medio. La inhibición por el ácido acético es mucho más elevada en las enzimas particulares que en las células enteras.

La oxidación del acetaldehido por las enzimas particulares muestra dos constantes aparentes. El ácido acético no inhibe de forma competitiva su oxidación.

La medida de las constantes aparentes para el oxigeno demuestra que la reacción acetaldehido-ácido acético queda interrumpida antes de la reacción etanol-acetaldehido cuando el medio se va empobreciendo progresivamente en oxigeno.

RIASSUNTO

CINETICA D'OSSIDAZIONE DELL'ETANOLO E DELL'ACETALDEIDE PER *ACETOBACTER MESOXYDANS*

L'autore esamina la cinetica d'ossidazione dell'etanolo e dell'acetaldeide da parte delle cellule intere e degli enzimi in particelle di *A. mesoxydans* isolato in un fermentatore sommerso in aceti.

Sulle cellule intere, l'ossidazione dell'etanolo in funzione della sua concentrazione mostra una cinetica con due costanti apparenti, $K_{m_1} = 1{,}8 \cdot 10^{-3}$M e $K_{m_2} = 3{,}9 \cdot 10^{-2}$M. Questa cinetica si trova di nuovo sugli enzimi in particelle. L'acido acetico è un inibitore competitivo dell'etanolo ossidazione ; esso interviene sotto la sua forma non dissociata ; inoltre esso entra in competizione con gli ioni H^+ dell' ambiente. L'inibizione dall'acido acetico è molto più elevata sugli enzimi in particelle che sulle cellule intere.

L'ossidazione dell' acetaldeide da parte degli enzimi in particelle mostra due costanti apparenti ; l'acido acetico non inibisce in modo competitivo la sua ossidazione.

La misura delle costanti apparenti per l'ossigeno mostra che la reazione acetaldeide acido acetico è fermata prima della reazione etanolo-acetaldeide quando l'ambiente diventa progressivamente povero in ossigeno.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIBA S., HUMPHREY A. E., MILLIS N. F., 1965. In *Biochemical engineering*. Academic Press, New York.

CONNER H. A., NICKOL G. B., WISTHOFF R. T., HILDERBRANDT F. M., 1959. *Vinegar new letter*, n° 27, U. S. Industrial chemical Cy, 99, Park avenue, New York.

DIVIES C., DUPUY P., 1969. Oxydation de l'acétate par *Acetobacter rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 339-350.

DIVIES C., DUPUY P., 1970. Mise en évidence d'acétaldéhyde facilement échangeable au cours de l'oxydation de l'éthanol par les particules d'*Acetobacter rancens*. *C. R. Acad. Sci.*, série D, **270**, 1182-1184.

DIVIES C., 1970. Cinétique de la fermentation acétique réalisée par *Acetobacter xylinum*. *Rev. Ferment. Industr. alim.*, **25**, 105-110.

DUPUY P., 1958. *Inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par* Acetobacter rancens. Thèse, Paris.

DUPUY P., MAUGENET J., 1962. Oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 219-225.

FRATEUR J., 1950. Essai sur la systématique des *Acetobacter*. *La Cellule*, **53**, 287.

KERSTERS K., DE LEY J., 1966. Primary and secondary alcohol deshydrogenases from *Gluconobacter*. In *Methods in enzymology*, vol. 9, 346-354. WOOD W. A., Academic Press, New York.

MAUGENET J., 1962. Les *Acetobacter* du cidre. Identification de quelques souches. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 45-53.

MORI A., KONNO N., TERUI G., 1970. Kinetic studies on submerged acetic acid fermentation. I. Behaviors of *Acetobacter rancens* cells toward dissolved oxygen. *J. Ferment. Technol.*, **48**, 203-212.

NAKAYAMA T., 1961. Studies on acetic acid bacteria. IV. — Purification and properties of a new type alcohol dehydrogenase, alcohol-cytochrome-553 reductase. *J. Biochem.*, Tokyo, **49**, 240-251.

SELEGNY E., BROUN G., THOMAS D., 1969. Enzymes en phase insoluble. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Effets dits « régulateurs » des membranes enzymatiques. *C. R. Acad. Sci.*, série D, **269**, 1330-1333.

TRUCHET R., 1958. In GRIGNARD V., *Traité de chimie organique*, vol. 9, Masson, Paris.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 17-24.

RECHERCHE ET DOSAGE DES PRODUITS DE BLÉ TENDRE DANS LES PÂTES ALIMENTAIRES PAR ÉLECTROPHORÈSE DES PROTÉINES SOLUBLES

P. FEILLET et K. KOBREHEL
avec la collaboration technique de Fatima RODRIGUEZ

Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz,
Centre de Recherches, I. N. R. A.,
34 - Montpellier

RÉSUMÉ

La teneur en blé tendre (*T. vulgare*) des pâtes alimentaires est déterminée par électrophorèse quantitative en gel de polyacrylamide (pH = 8,6) des protéines solubles ; la méthode repose sur la mesure des concentrations relatives en deux protéines *a* et *b* respectivement prédominantes chez les blés tendres et les blés durs.

Mots clés : *pâtes alimentaires, blé dur, blé tendre, protéines, falsification.*

INTRODUCTION

La mise au point d'une méthode de détection et de dosage des produits de blé tendre dans les pâtes alimentaires préoccupe depuis de nombreuses années les pays, tels la France et l'Italie, où l'incorporation de ces produits est interdite par la loi.

La majorité des études consacrées à ce problème s'inspire des travaux de MATVEEF (1952) ou de BROGIONI et FRANCONI (1963). Ceux-ci ont fait l'objet de nombreuses études critiques (GUILBOT *et al.*, 1959 ; GARCIA-FAURE *et al.*, 1965 *a* et *b* ; CUSTOT *et al.*, 1966 ; STURM *et al.*, 1966 ; FRUCHARD *et al.*, 1967 ; SEMPIO, 1969) dont les conclusions convergentes sont les suivantes :

— de nombreux blés tendres réagissent négativement, comme les blés durs, au test au palmitate de sitostérol ;

— le test BROGIONI n'est applicable qu'aux semoules, farines et produits dérivés, à l'exclusion des autres produits de mouture ;

— une évaluation quantitative est impossible avec l'une ou l'autre de ces deux méthodes lorsque les matières premières sont inconnues.

Les méthodes plus précises de détermination de la teneur en palmitate de sitostérol, telles celles proposées par GILLES et YOUNGS (1964) ou GRUNER et BERNAERTZ (1968), n'échappent malheureusement pas à ces critiques.

Le dosage du phosphore phytique (COVELLO et SHETTINO, 1966), l'identification des composés glycolipidiques (CAVALARRO, 1966) ou la caractérisation de l'amidon (CIOTTOLI-SOLLAZZO, 1966 ; DEL VECCHIO, 1969) ont été également proposés pour différencier les blés durs des blés tendres mais ne semblent pas pouvoir être retenus à des fins quantitatives.

On observe depuis quelques années une nouvelle orientation des travaux. Faisant suite aux observations de PENCE *et al.* (1954) et de FEILLET et BOURDET (1964, 1967) suivant lesquelles les blés tendres se différencient des blés durs par le comportement électrophorétique de leurs albumines, RESMINI (1968) propose de déterminer quantitativement les produits de blés tendres dans les pâtes alimentaires par électrophorèse en disque de polyacrylamide d'albumines purifiées par précipitations successives au sulfate d'ammonium. SILANO *et al.* (1968) et RESMINI et DE BERNARDI (1969) simplifient le protocole expérimental en modifiant les conditions d'isolement des albumines mais diminuent la précision de la méthode. Selon GARCIA-FAURE *et al.* (1969), il est possible de déceler, dans la majorité des cas, la présence de 30 p. 100 et plus de blé tendre dans les pâtes alimentaires par électrophorèse à pH = 3,2 d'un extrait aqueux de pâtes broyées. L'imprécision de cette méthode conduit les mêmes auteurs (GARCIA-OLMEDO et GARCIA-FAURE, 1969) à doser par un procédé similaire des constituants lipoprotéiques extraits par le mélange chloroforme-méthanol (2 : 1) ; le dosage des lipoprotéines solubles dans l'éther de pétrole permet également de différencier les blés durs des blés tendres (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1968).

Par immunoélectrophorèse, CANTAGALLI *et al.* (1969) et PIAZZI et CANTAGALLI (1969) décèlent la présence de blés tendres lorsque ceux-ci constituent 10 p. 100 au moins du mélange.

L'ensemble de ces méthodes n'échappe pas à l'une ou l'autre des critiques suivantes : ou bien le protocole expérimental est très simple (méthode GARCIA-FAURE *et al.*, 1969, par exemple) mais les résultats sont plus qualitatifs que quantitatifs ; ou bien la méthode est apparemment très précise et sensible (méthode RESMINI, 1968, par exemple) mais l'expérimentation est alors longue et compliquée.

La méthode que nous décrivons dans ce mémoire réalise un compromis entre ces deux tendances.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Échantillons étudiés*

Des pâtes alimentaires ont été fabriquées au laboratoire dans les conditions précédemment décrites (KOBREHEL, 1971) à partir de semoules, pures ou en mélanges, extraites du blé dur *Bidi 17* ou du blé tendre *Goya*.

2. — *Extraction des protéines solubles*

Un gramme de pâtes broyées de manière à ce que 90 p. 100 des particules traversent un tamis de 0,31 mm d'ouverture après 5 minutes d'agitation est mis en suspension dans 3 ml de tampon *Tris*, pH = 8,6 (*Tris* : 4 g ; EDTA : 400 mg ; acide borique : 300 mg ; eau désionisée : q.s.p. 1 000 ml).

Après une heure de contact à température ordinaire, on centrifuge 60 minutes à 35 000 *g* à 4°C. Les protéines ainsi solubilisées sont fractionnées par électrophorèse sans autre purification.

3. — *Électrophorèse*

La séparation électrophorétique est effectuée en gel de polyacrylamide à 6 p. 100 dans le tampon *Tris* décrit ci-dessus.

Le gel est préparé de la manière suivante : on dissout 17,53 g d'acrylamide (Fluka) et 0,47 g de N.N'-méthylène-*bis*-acrylamide (Fluka) (ou 18 g du mélange commercial Cyanogum 41) dans 300 ml d'eau désionisée ; après dissolution et filtration, on ajoute 1 ml de diméthyl-aminopropionitrile et 300 mg de persulfate d'ammonium. La solution bien homogénéisée est alors versée dans une cuve de la dimension du gel. Au bout de 2 heures, le gel polymérisé est placé dans 3 litres environ de tampon *Tris*. Le gel est prêt à l'emploi après une quinzaine d'heures.

Les dépôts sont de 70 µl environ. Un champ électrique de 5 V/cm (approximativement 40 mA pour un gel de 6 mm d'épaisseur et 15 cm de large) est appliqué pendant 4 heures 30.

Après fractionnement, les protéines sont colorées par l'Amidoschwartz 10 B dans les conditions déjà décrites (Kobrehel et Feillet, 1971).

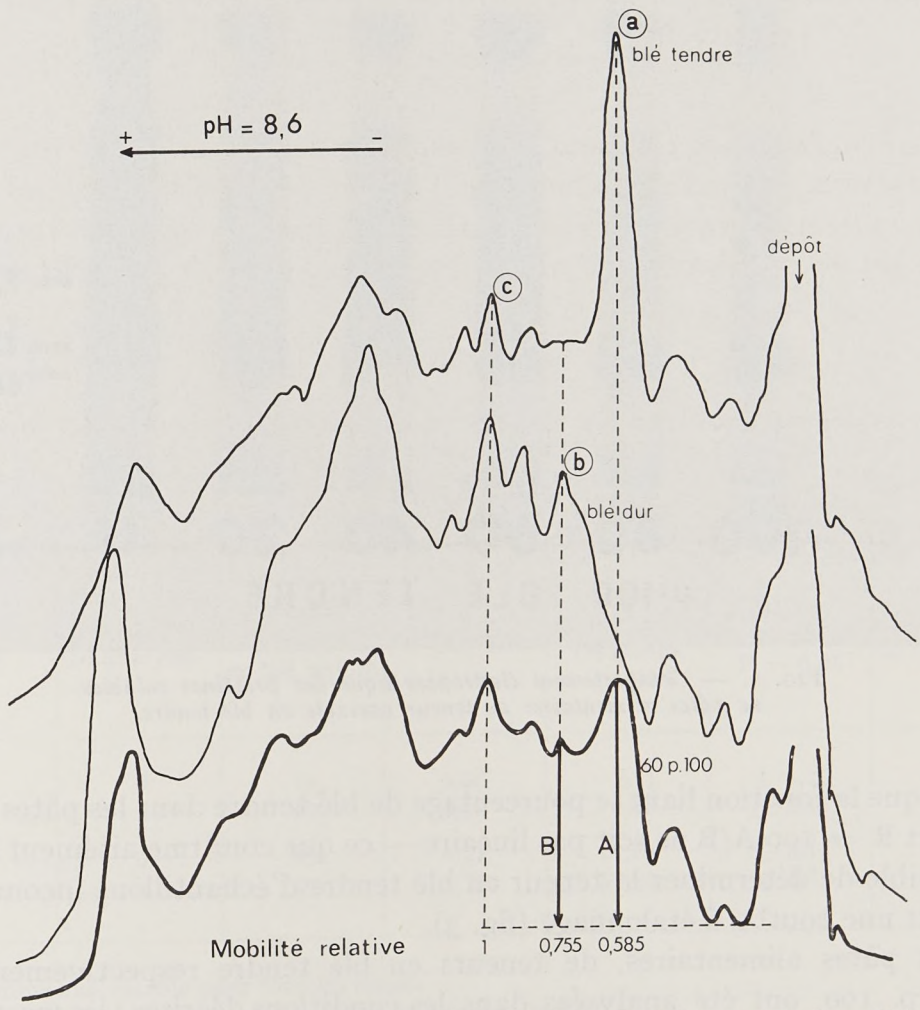


Fig. 1. — *Détermination de la teneur en blé tendre par calcul du rapport* $R = 100\ A/B$

4. — *Détermination de la teneur en blé tendre*

Le calcul de la teneur en blé tendre repose sur la détermination de la concentration d'une protéine *a* présente en quantité importante dans les blés tendres relativement à une protéine *b* prédominante chez les blés durs.

On identifie aisément les protéines *a* et *b* en se référant à la protéine *c* commune aux deux espèces de blé ; leurs mobilités relatives sont en effet respectivement 0,585 (*a*), 0,755 (*b*) et 1 (*c*).

Après dépouillement densitométrique de l'électrophorégramme (fig. 1) (appareil Vitatron, filtre 624 nm), on mesure les hauteurs A et B des pics *a* et *b*.

De la valeur du rapport R = 100 A/B, on déduit la teneur en blé tendre des échantillons inconnus par comparaison avec des pâtes témoins contenant respectivement 0, 20, 40 et 60 p. 100 de blé tendre.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ainsi que l'illustre le diagramme électrophorétique de la figure 2, l'accroissement de la teneur en blé tendre des pâtes alimentaires se traduit par une augmentation de la concentration de la protéine *a* aux dépens de la protéine *b*.

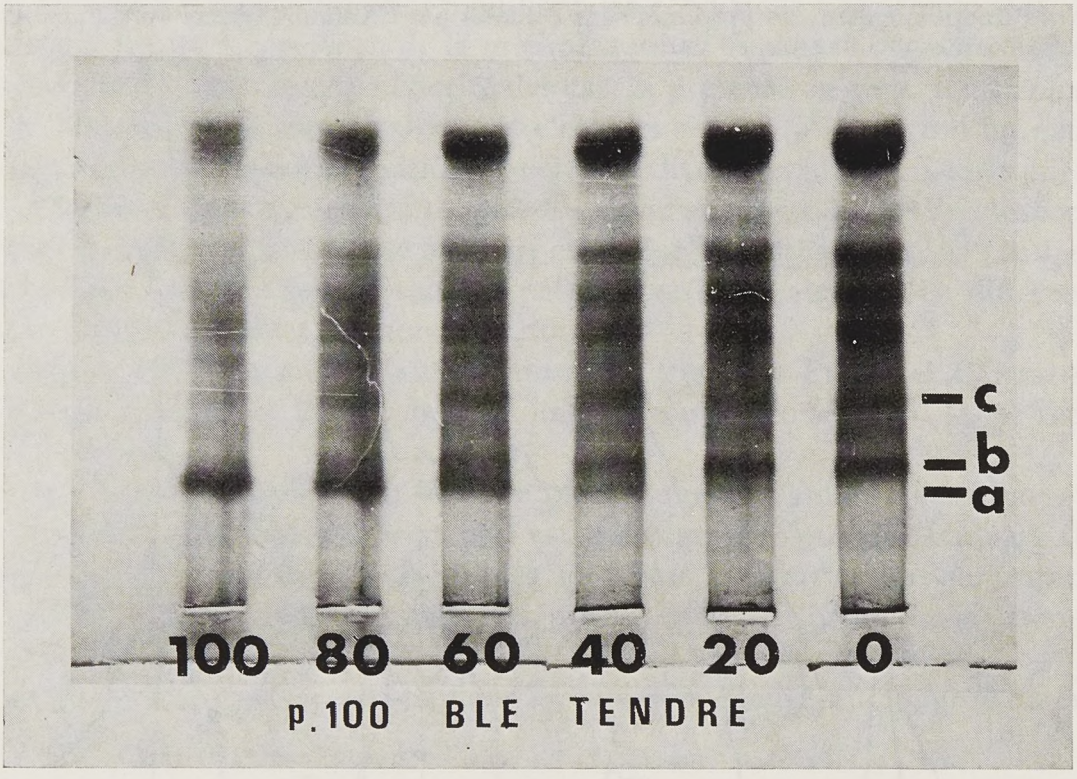


FIG. 2. — *Comportement électrophorétique des protéines solubles de pâtes alimentaires de teneur variable en blé tendre*

Bien que la fonction liant le pourcentage de blé tendre dans les pâtes à la valeur du rapport R = 100 A/B ne soit pas linéaire — ce que confirme aisément le calcul — il est possible de déterminer la teneur en blé tendre d'échantillons inconnus en portant R sur une courbe d'étalonnage (fig. 3).

Deux pâtes alimentaires, de teneurs en blé tendre respectivement égales à 10 et 60 p. 100, ont été analysées dans les conditions décrites : les mesures ont été faites sur 3 gels différents, à raison de 2 ou 3 dépôts par gel ; les valeurs de R ont été

rapportées soit à une courbe d'étalonnage standard, moyenne de 5 déterminations entièrement indépendantes, soit à des courbes d'étalonnage interne établies en introduisant des pâtes témoins dans chaque essai.

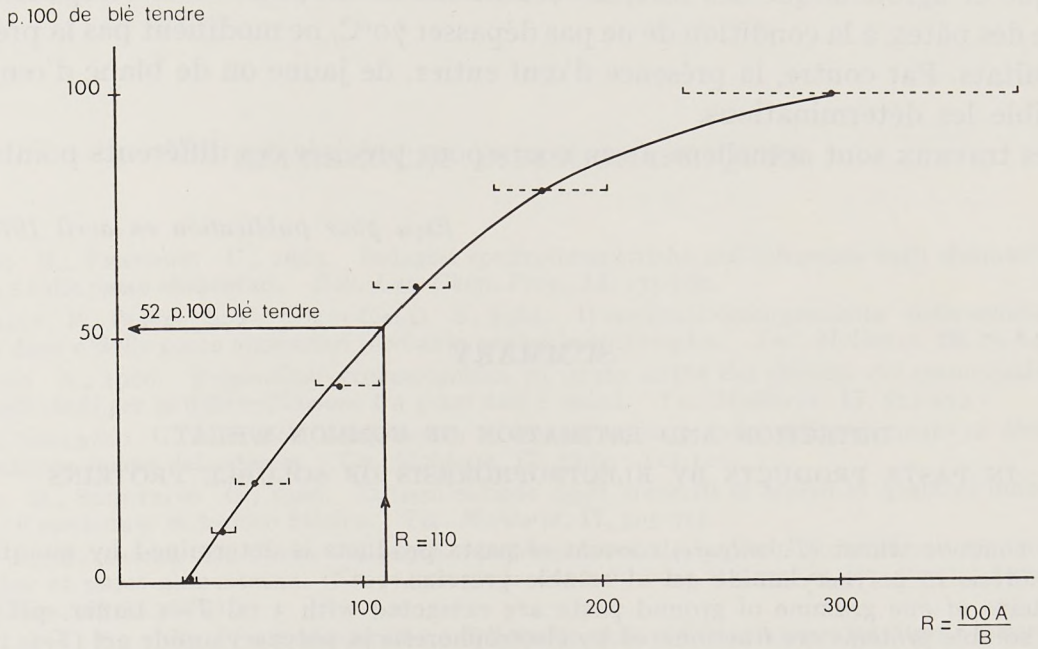


FIG. 3. — *Relation entre la quantité de blé tendre incorporée aux pâtes alimentaires et la valeur du rapport* $R = 100\ A/B$ (voir fig. 1)

(Moyenne de 5 expériences et indication des valeurs extrêmes)

Les résultats du tableau I montrent que dans tous les cas les valeurs moyennes sont proches des valeurs théoriques et que l'introduction de témoins internes accroît considérablement la précision des mesures. Dans ces conditions, les erreurs absolues sont approximativement égales pour les pâtes à 10 ou à 60 p. 100 de blé tendre ;

TABLEAU I

Moyennes, écarts-types et coefficients de variation des teneurs en blé tendre déterminées sur deux échantillons. Influence de la courbe d'étalonnage

Courbe d'étalonnage	Nombre d'analyses	Teneur théorique en blé tendre	Écart-type	Teneur en blé tendre (Moyenne calculée)	Limites de confiance P = 0,05	Coefficient de variation
Standard (1)	9	10	5,56	7,11	± 4,20	78,1
Interne (2)	9	10	2,88	8,33	± 2,17	34,5
Standard	6	60	6,17	60,66	± 6,17	10,1
Interne	6	60	1,75	58,83	± 1,75	2,9

(1) Courbe moyenne valable pour tous les essais.
(2) Courbe établie pour chaque essai à l'aide de témoins internes.

l'erreur relative, appréciée par le coefficient de variation est, par contre, beaucoup plus élevée pour les échantillons de faible teneur en blé tendre.

Des essais complémentaires, non rapportés ici, semblent montrer que l'origine génétique et agronomique des blés, les conditions de mouture et la température de séchage des pâtes, à la condition de ne pas dépasser 70°C, ne modifient pas la précision des résultats. Par contre, la présence d'œuf entier, de jaune ou de blanc d'œuf rend impossible les déterminations.

Des travaux sont actuellement en cours pour préciser ces différents points.

Reçu pour publication en avril 1972.

SUMMARY

DETECTION AND ESTIMATION OF COMMON WHEAT IN PASTA PRODUCTS BY ELECTROPHORESIS OF SOLUBLE PROTEINS

The common wheat (*T. vulgare*) content of pasta products is determined by quantitative electrophoresis in polyacrylamide gel of soluble proteins.

Proteins of one gramme of ground pasta are extracted with 3 ml *Tris* buffer, pH = 8.6.

The soluble proteins are fractionated by electrophoresis in polyacrylamide gel (*Tris* buffer ; 6 p. 100 gel ; 5 V/cm ; 4 h 30 mn.) and stained with Amidoschwartz. After densitometry of the electrophoregrams, the heights A and B of the peaks related to proteins *a* and *b*, respectively predominant in common and durum wheat, are measured. The common wheat content is deduced from the value of the R = 100 A/B ratio.

The presence of egg in the products prevents estimations.

RESUMEN

INVESTIGACION Y DOSIFICATION DE LOS PRODUCTOS DEL TRIGO CANDEAL EN LAS PASTAS ALIMENTICIAS POR ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS SOLUBLES

El contenido en trigo candeal (*T. vulgare*) de las pastas alimenticias queda determinado por electroforesis quantitativa en gel de poliacrilamida de las proteinas solubles.

Un gramo de pastas molidas es puesto en suspensión en 3 ml de tampon *Tris*, pH = 8,6. Las proteines solubilizadas son fraccionadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (tampon *Tris* ; gel a 6 p. 100 ; 5 V/cm ; 4 horas 30 mn) y coloreadas por el Amidoschwartz. Previa densitometria de los electroforegramas, se miden las alturas A y B de los picos correspondiantes a las proteinas *a* y *b* respectivamente predominantes en el caso de los trigos candeales y los trigos duros. El contenido en trigo candeal queda deducido del valor de la relación R = 100 A/B.

La presencia de huevo en las pastas impide la dosificación.

RIASSUNTO

RICERCA E DOSAGGIO DEI PRODOTTI DI GRANO TENERO NELLA PASTA MEDIANTE ELETROFORESI DELLE PROTEINE SOLUBILI

Il tenore di grano tenere (*T. vulgare*) nelle paste è determinato mediente elettroforesi quantitativa in gel di poliacrilammide delle proteine solubili.

Un gramme di paste mecinate è masso in sospensione in 3 ml di tampone *Tris*, pH = 8,6. Le proteine solubilizzate sone frazionate mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide (tam-

pone *Tris* : gel = 6 p. 100 ; 5 V/cm ; 4 ore e mezze) e colorate dall'Amidoschwartz. Dopo densitometria degli elettroforegrammi, sono misurate le altezze A e B dei picchi corrispondenti alle proteine *a* e *b* rispettivamente predominanti nei grani teneri e nei grani duri. Il tenere di grano tenero si deduce del valore del rapporto R = 100 A/B.

Le presenza d'uovo nella pesta impedisce il dosaggio.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brogioni M., Franconi U., 1963. Indagini spettrofotometriche nell'infrarosso sugli sfarinati di frumento e sulle paste alimentari. *Boll. Lab. Chim. Prov.*, **14**, 135-160.

Cantagalli P., Piazzi S. E., Sordi-Galli S., 1969. Il controllo della genuinita' delle semole di frumento duro e delle paste alimentari mediante analisi immunologica. *Tec. Molitoria*, **20**, 79-84.

Cavallaro A., 1966. Separazione cromatografica su strato sottile dei glicolipi del grano quale contributo agli studi per la differenziazione fra grani duri e teneri. *Tec. Molitoria*, **17**, 553-559.

Ciottoli Sollazzo G. L., 1966. La presenza di legami amido-proteici come elemento di distenzione del *Triticum durum* dal *sativum*. *Tec. Molitoria*, **17**, 57-60 ; 121-125.

Covello M., Schettino O., 1966. Determinazione degli sfarinati di tenero in quelli di duro e nelle paste : il contenuto di fosforo fitinico. *Tec. Molitoria*, **17**, 505-515.

Custot F., Mezonnet R., Caley M., 1966. Différenciation des produits au blé dur et au blé tendre, semoules et pâtes alimentaires. (Étude comparée des méthodes Matveef et Brogioni.) *Ann. Falsif. Exp. Chim.* (672), 300-316.

Del Vecchio M., 1969. La desimentazione dell-amido nella differenziazione tra duro e tenero. *Tec. Molitoria*, **20**, 150-151.

Feillet P., Bourdet A., 1964. Sur le comportement électrophorétique en gel d'amidon des protéines du blé solubles en milieu salin neutre. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 2929-2932.

Feillet P., Bourdet A., 1967. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 1273-1283.

Fruchard C., Poma J., Bure C., 1967. Contribution à l'étude de la différenciation des blés durs et des blés tendres. *Ann. Falsif. Exp. Chim.*, **60**, 193-205.

Garcia-Faure R., Matia E. R., Dier T. H., 1965 *a*. Identificacion de productos de *Triticum aestivum* en las pastas alimenticias. I. — Determinacion espectrofotemotrica en el infrarrojo. *Inst. Nat. Invest. Agron.*, **25**, 385-393.

Garcia-Faure R., Garcia-Olmedo F., Aboy I. S., Andreu M. S., 1965 *b*. Identificacion de productos de *Triticum aestivum* en las pastas alimenticias. II. — Determinacion colorimetrica del palmitato de sitosterol. *Inst. Nat. Invest. Agron.*, **25**, 395-408.

Garcia-Faure R., Merck-Luengo J. G., Garcia-Olmedo F., 1969. Detection of flour of farina from *Triticum aestivum* in macaroni by starch-gel electrophoresis of water soluble proteins. *Cereal. Chem.*, **46**, 621-625.

Garcia-Olmedo F., Sotelo I., Garcia-Faure R., 1968. Identificacion de productos de *Triticum aestivum* en las pastas alimenticias. IV. Lipoproteinas solubles en eter de petroleo. *Inst. Nat. Invest. Agron.*, **25**, 385-393

Garcia-Olmedo F., Garcia-Faure R., 1969. A new method for the estimation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in pasta products. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, **2**, 94-96.

Gilles K. A., Youngs V. L., 1964. Evaluation of *durum* wheat and *durum* products. II. — Separation and identification of the sitosterol ester of semolina. *Cereal Chem.*, **41**, 502-513.

Gruner M., Bernaertz M., 1968. Beitrage zur struktur der sterolester des weizens and zur unterscheidung zwischen weichen und hartem weizen. *Getreide und Mehl*, **9**, 69-74.

Guilbot A., Brebant R., Mercier C., 1959. Recherches sur les esters de stérols dans les blés et leur intérêt éventuel pour la différenciation des blés « *durum* » et des blés « *vulgare* ». *Berichte auf der* Durum *und Teigwaren Tagung*. Detmold. R. F. A.

Kobrehel K., 1971. Détermination de la teneur en œuf des pâtes alimentaires. I. — Par analyse de la fraction lipidique : dosage des lipides, de la choline et des acides gras. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 75-87.

Kobrehel K., Feillet P., 1971. Détermination de la teneur en œuf des pâtes alimentaires. II. — Séparation électrophorétique et dosage de protéines spécifiques. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 153-165.

Matveef M., 1952. Détection des farines de blé tendre dans les semoules et pâtes alimentaires. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **39**, 658-663.

Pence J. W., Westein N. W., Mecham D. K., 1954. Differences in the distribution of components in albumin preparation from *durum* and common wheat flours. *Cereal Chem.*, **31**, 396-406.

Piazzi S. E., Cantagalli F., 1969. Immunochemical analysis on soluble proteins of wheat. *Cereal Chem.*, **46**, 642-646.

Resmini P., 1968. Un nuovo metodo per identificare e dosare gli sfarinati di grano tenero presenti in quelli di grano duro e nelle paste alimentari. *Tec. Molitoria*, **19**, 145.

Resmini P., De Bernardi G., 1969. Possibilita di semplificare il metodo elettroforetico Resmini per la ricerca ed il dosaggio dei prodotti di grano tenero in quelli di grano duro. *Tec. Molitoria*, **20**, 70-76.

Sempio G., 1969. Una perizia sulla validita del metodo Brogioni. *Tec. Molitoria*, **20**, 223-238.

Silano V., D'Errico A. M., Pocchiari F., Tassi-Micco C., Muntoni F., 1968. Indagini elettroforetiche sui cereali. II. — Riconoscimento e dosaggio del grano tenero in sfarinati e paste alimentari. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **4**, 641-643.

Sturm P. A., Parkhurst R. M., Skinner W. A., 1966. Brogioni-Franconi analytical method applied to whole wheat, flour and pasta. *Cereal Sci. To-Day*, **11**, 523-528.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 25-33.

COMPOSITION DE LA CIRE CUTICULAIRE DE LA PRUNE D'ENTE

C. JOURET et J.-L. PUECH

Laboratoire de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Toulouse, I. N. R. A.,
B. P. 12, 31 - Castanet-Tolosan

RÉSUMÉ

La cire cuticulaire de la prune d'Ente joue un rôle très important durant la déshydratation du fruit frais pour l'obtention du pruneau, et la connaissance de sa composition permettrait d'intervenir rationnellement pour réduire la durée du séchage.

On extrait, au chloroforme, 190 µg de cire totale en moyenne par cm² d'épiderme de fruit. La séparation initiale en 6 fractions de composants a été faite par chromatographie sur couche mince, les déterminations plus précises des éléments dans chaque famille ou groupe se faisant par chromatographie en phase gazeuse, par spectroscopie infrarouge ou par spectrométrie de masse.

On a pu mettre en évidence des hydrocarbures, des stérides, des esters, des acides gras, des alcools primaires et secondaires, du glycérol et un acide triterpénique : l'acide oléanolique ; par contre, on n'a retrouvé ni aldéhydes, ni cétones, rencontrées dans d'autres cires de fruits.

Mots clés : *prune d'Ente, cire cuticulaire.*

I. — INTRODUCTION

La cire cuticulaire intervient d'une façon primordiale dans les échanges de gaz et d'eau entre les tissus végétaux sous-jacents et l'atmosphère ; son influence sur la déshydratation des fruits, en particulier, est importante sur le plan technologique.

Divers auteurs ont, d'ailleurs, souligné le rôle de barrière d'eau joué par la cire cuticulaire durant les opérations de séchage des fruits ; en particulier, RADLER (1965) note une déshydratation plus active de la baie de raisin après l'élimination de la cire par trempage des baies dans le chloroforme ou l'éther de pétrole ; SIVADJIAN (1968) relève une perte d'eau trois fois plus rapide pour une pomme lavée à l'éther de pétrole que pour une pomme intacte.

GRNCAREVIC et RADLER (1967) ont recherché parmi les divers constituants des cires du raisin les composés responsables du phénomène de rétention d'eau : les alcools, les hydrocarbures et les aldéhydes paraissent les plus efficaces ; les acides gras et les acides terpéniques, surtout, ont une action nettement moins grande.

La prune d'Ente étant, en général, commercialisée sous forme de pruneau, il est intéressant de préciser la composition de la cire cuticulaire du fruit frais pour tenter de réduire la durée de l'opération de séchage par une action raisonnée sur certains constituants.

II. — MODE OPÉRATOIRE - MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

1. — *Récupération de la cire cuticulaire*

Les prunes d'Ente analysées proviennent d'un verger du domaine expérimental I. N. R. A. de la Tour-de-Rance à Bourran (Lot-et-Garonne). Après la cueillette, les fruits sont essuyés ; on mesure les deux grands axes afin de calculer la surface du fruit, assimilée à un ellipsoïde. Après divers essais, l'extraction de la cire a été effectuée par trempage dans le chloroforme RP durant 24 heures à la température du laboratoire ; l'extrait chloroformique est lavé à l'eau distillée et déshydraté à l'aide de sulfate de sodium. Le résidu solide est pesé après évaporation du solvant, sous vide, à basse température.

2. — *Techniques analytiques*

La séparation préliminaire d'un certain nombre de fractions a été effectuée à l'aide d'une chromatographie sur couche mince (200 × 200 × 0,25 mm) de gel de silice Merck (Kieselgel G) en utilisant comme solvant de développement le mélange éther de pétrole (40°-45°C)-éther éthylique RP (7/3, v/v) suivant la technique de RANDERATH (1964). Le gel de silice est purifié dans un appareil de Soxhlet à l'aide d'éther éthylique RP pendant 24 heures. L'éther de pétrole est traité par de petites quantités d'acide sulfurique concentré jusqu'à l'arrêt de son brunissement, lavé à l'eau, séché par du sulfate de sodium et distillé : on recueille la fraction de point d'ébullition 40°C-45°C.

Afin de préciser la nature des composants ainsi séparés, d'autres systèmes de solvants ont été utilisés suivant les techniques décrites par HOLLOWAY et CHALLEN (1966) : tétrachlorure de carbone, benzène-chloroforme (7/3, v/v), chloroforme-acétate d'éthyle (1/1, v/v).

Le révélateur général est la rhodamine B.

Les révélations spécifiques sont faites suivant les techniques décrites par WALDI (1965): par la ninhydrine pour les composés azotés, le réactif molybdique pour les composés phosphorés, la vanilline - acide sulfurique pour les alcools, la dinitrophénylhydrazine pour les cétones et les aldéhydes, le test de Lieberman-Burchard pour les triterpènes et les stéroïdes.

Les fractions ont été obtenues par chromatographie sur couche mince préparative de gel de silice (200 × 200 × 1 mm) ; la quantité de cire, déposée à 2 cm du bord inférieur en une bande fine et régulière, est de 50 mg par plaque ; la migration demande environ 40 minutes pour une distance frontale de 15 cm. Après grattage et récupération, l'élution des diverses fractions est effectuée par l'éther éthylique.

L'identification des groupements fonctionnels des composés se fait par spectroscopie infrarouge (modèle Beckman IR-12), la détermination des acides, alcools, hydrocarbures à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Perkin-Elmer 2 F/F 6 sur colonne de SE 30 à 10 p. 100 sur chromosorb P 100-120 mesh, de 1/4'' de diamètre et de 50 cm de longueur ; la température du four est de 155°C et les débits d'azote, d'air et d'hydrogène sont respectivement de 40, 400 et 35 ml/mn. Le glycérol est identifié, selon les mêmes conditions expérimentales du chromatographe, sur une colonne de Porapack Q de 1 mètre de long et 1/4'' de diamètre, ou par chromatographie sur papier (Whatman n° 1 ; solvant : butanol 1, acide acétique, eau, 4/1/5 ; révélation à l'acide periodique et la benzidine). Le spectromètre de masse, modèle CH 5 de Varian MAT, a permis de déterminer les alcools secondaires et l'acide oléanolique.

III. — RÉSULTATS

Durant les deux campagnes 1970 et 1971, malgré des conditions climatiques très différentes, la quantité globale de cire cuticulaire, récupérée sur plusieurs échantillons de prunes, a été pratiquement constante et voisine de 190 µg par cm^2 de pellicule.

L'analyse préliminaire, par chromatographie sur couche mince de silice, a permis de différencier six taches notées de A à F et de Rf respectifs : 0,88 ; 0,69 ; 0,55 ; 0,30 ; 0,15 ; 0,07.

La fraction A, par la valeur de son Rf (0,88) dans le système de solvant utilisé, et par sa réaction négative aux tests de coloration spécifiques, semble correspondre à des hydrocarbures.

Cependant, après récupération par chromatographie en couche mince préparative, le spectre infrarouge indique la présence d'une fraction ester par une bande d'absorption à 1 735 cm^{-1}.

Une nouvelle chromatographie sur couche mince à l'aide de tétrachlorure de carbone permet de séparer deux séries de composés fonctionnels : celle de Rf élevé (égal à 0,78) correspond à des hydrocarbures (Holloway et Challen, 1965), ce qui est confirmé par spectroscopie IR (bandes : 720, 1 460, 1 470, 2 850, 2 925 et 2 960 cm^{-1}) ; la séparation des composés de ce groupe par chromatographie en phase gazeuse montre la présence de 88 p. 100 de nonacosane et de 4 p. 100 d'heptacosane, le reste étant représenté par tous les hydrocarbures de C_{23} à C_{31}, en quantité faible et pratiquement identique (tabl. 1, col. 2).

TABLEAU I

Constituants de la cire de la prune d'Ente
Identification individuelle des hydrocarbures et alcools libres ou estérifiés

Résultats donnés en pourcentage après séparation par chromatographie en phase gazeuse

Nbre de carbone	Hydrocarbures saturés	Alcools primaires estérifiés	Alcools primaires libres
	fraction A	fraction B	fraction D
20	—	1,5	0,8
21	—	1,3	0,7
22	—	7,5	1,5
23	1,8	6,3	1,7
24	0,9	26,5	40,6
25	0,9	6,0	2,7
26	0,5	18,0	35,2
27	4	1,4	0,8
28	0,9	31,5	12,6
29	88,5	traces	0,4
30	0,5	—	3,0
31	2	—	—

La deuxième tache, séparée par le tétrachlorure de carbone, de Rf = 0,35, contient la fraction ester ; après saponification et chromatographie sur couche mince de l'insaponifiable, le test de Lieberman-Burchard est positif ; on se trouve en présence de stérols qui n'ont pu être complètement identifiés ; le β-sitostérol serait le composant majeur.

La fraction B, de Rf 0,69, rassemble des esters ainsi que l'atteste la chromatographie dans les différents systèmes de solvants utilisés ; la spectroscopie IR confirme la présence du groupement ester (bande à 1 735 cm^{-1}).

Une saponification, à l'aide de potasse méthanolique à 6 p. 100 pendant 4 heures sous reflux, permet d'obtenir des alcools primaires et des acides qui peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats ont été rassemblés dans les tableaux 1, colonne 3, et 2, colonne 3.

TABLEAU 2

Constituants de la cire de la prune d'Ente
Identification individuelle des acides libres ou estérifiés

Résultats donnés en pourcentage après séparation par chromatographie en phase gazeuse

Nbre de carbone	Acides libres cire globale	Acides estérifiés fraction B	Acides estérifiés cire globale
10		traces	0,8
11		—	traces
12	5,5	6,4	5,1
13	traces	traces	traces
14	0,2	1,4	1,1
15	traces	traces	0,3
16	1,2	9,3	20,2
17		traces	0,7
18	0,2	7	18
18 :		5,6 (12,6)	11,9 (29,9)
19	0,3	1,2	traces
20	0,3	2,9	2,1
21	0,3	2	traces
22	0,7	2,6	1,9
23	0,6	2,3	1
24	5,3	16	11,9
25	1,3	3	0,8
26	30,6	9,3	10,7
27	2,7	5,6	traces
28	51,2	16,7	10,9
29	traces	2,9	traces
30		5,8	3,1

On peut noter la prédominance d'alcools en C_{28}, C_{24}, C_{26} et celle d'acides en C_{28} et C_{24}, déterminés à l'aide d'échantillons purs témoins, par identité des temps de rétention.

La fraction C, de Rf 0,55, présente des analogies avec des alcools secondaires dans les différents systèmes de solvants utilisés par Holloway et Challen (1966).

Cette hypothèse est confirmée par spectroscopie IR qui montre la présence de composés à longue chaîne possédant un groupement hydroxyle (bande à 3 200 - 3 400 cm^{-1}).

La spectrométrie de masse a permis d'identifier les composés majeurs présents au nocacosane 10-ol (88 p. 100) et à l'heptacosane 8-ol (10 p. 100).

La fraction D, de Rf 0,30, correspondrait à des alcools primaires à longue chaîne ainsi que le montre la chromatographie dans les différents systèmes de solvants utilisés. Le test à la vanilline - acide sulfurique est positif et le spectre IR indique la présence du groupement hydroxyle (bande à 3 200 - 3 400 cm^{-1}).

La séparation par chromatographie en phase gazeuse montre que le tétracosanol, l'hexacosanol et l'octacosanol sont les composants quantitativement les plus importants (tabl. 1, col. 4).

La fraction E, de Rf 0,15, est un mélange complexe comprenant en particulier des esters, mais le dépouillement du spectre IR reste, cependant, difficile à interpréter.

Toutefois, on peut affirmer la présence de glycérol dans la fraction hydrosoluble obtenue après saponification. Ce trialcool est mis en évidence par chromatographie sur papier et par chromatographie en phase gazeuse.

La fraction F, de Rf 0,07, est formée d'un mélange complexe de composés polaires ; cependant la réaction de Lieberman-Burchard ainsi que celle au trichlorure d'antimoine s'avèrent positives ce qui, lié à la valeur du Rf dans ce système de solvant et de support, semble indiquer la présence d'un triterpène.

TABLEAU 3

Constituants de la cire de prune d'Ente
(Récapitulation des résultats)

Analyse préliminaire		Composants principaux	Résultats détaillés
Fraction	Groupe fonctionnel		
A	Hydrocarbure Stéride	Nonacosane, heptacosane Stérol	Tableau 1, col. 2
B	Esters	Alcools primaires (C_{28}, C_{21}, C_{26}) Acides (C_{28}, C_{24}, C_{18})	Tableau 1, col. 3 Tableau 2, col. 3
C	Alcools secondaires libres	Nocacosane 10-ol Heptacosane 8-ol	
D	Alcools primaires libres	Tétracosanol Hexacosanol Octacosanol	Tableau 1, col. 4
E		Glycérol	
F	Triterpène	Acide oléanolique	

Pour isoler ce composé triterpénique, une purification plus poussée a été effectuée par une nouvelle chromatographie sur couche mince à l'aide de chloroforme-acétate d'éthyle (1/1, v/v). Le composé triterpénique a dans ce cas un Rf de 0,46.

La détermination faite par spectrométrie de masse après récupération de cette

fraction montre qu'il s'agit d'acide oléanolique ; aucune trace d'acide ursolique, signalé dans la cire d'autres fruits, n'a été mise en évidence.

De même, nous n'avons pas pu révéler de composés à fonction aldéhydique ou cétonique retrouvés également dans d'autres fruits.

Le tableau 3 présente la récapitulation générale des résultats analytiques obtenus sur les fractions séparées par chromatographie en couche mince.

Après ces séparations sur couche mince, un certain nombre de déterminations ont été faites sur la cire globale, celles qui étaient facilement réalisables, c'est-à-dire : la détermination des acides libres et estérifiés (tabl. 2, col. 2 et 4), et la confirmation de la présence du glycérol et des stérols.

Nous avons rassemblé, dans le tableau 4, les divers résultats analytiques obtenus qui permettent de donner une image approximative de la composition, en poids, des différents groupes fonctionnels retrouvés dans la cire de prune d'Ente.

TABLEAU 4

Composition globale de la cire de prune d'Ente

(Pourcentage en poids des constituants obtenus après chromatographie sur couche mince de gel de silice)

Hydrocarbures	9
Stérides	15
Alcools primaires libres	17
Alcools secondaires libres	21
Acides libres	3
Esters	19
Acide oléanolique libre	6
Non identifiés	10
	100

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

La présence de triterpène a été signalée depuis longtemps dans la cire des fruits ; on retrouve, à la fois, les acides ursolique et oléanolique dans la pomme (Brieskorn et Klinger, 1963), l'acide ursolique seul dans la merise (Markley et Sando, 1934), dans la cerise (Power et Moore, 1910), dans les tiges et les feuilles de fraisier (Sosa, 1950) ; Van Die et Soemarsono (1957) ont trouvé de l'acide oléanolique dans la cire du fruit de *Fagraea borneensis*. L'acide oléanolique est très abondant dans la cuticule du raisin (Radler et Horn, 1965) représentant 70 p. 100 en poids de la cire cuticulaire de la baie.

Dans la prune d'Ente, on ne trouve que de l'acide oléanolique ; celui-ci constitue une part modeste (de l'ordre de 6 p. 100) de la cire totale.

Dans le groupe des terpènes, outre ces acides triterpéniques, abondamment rencontrés, Brieskorn et Reinartz (1967) citent les α- et β-amyrines.

Cependant, si les composés terpéniques sont souvent largement représentés

dans les cires, ils ne sont pas, pour autant, toujours présents ; ainsi, aucun triterpène n'a été décelé dans la cire de carnauba ou de candelilla (HOLLOWAY, 1967).

Parmi les autres composés mis en évidence dans la cire des prunes d'Ente, les alcools primaires libres sont quantitativement importants, représentant environ 17 p. 100 du poids total de cire recueillie, 75 p. 100 des alcools primaires étant constitués par le tétracosane-1-ol et l'hexacosane-1-ol.

HOLLOWAY (1967) retrouve 24 p. 100 d'alcools primaires dans la cire de canne à sucre et RADLER (1968) 12 p. 100 dans celle de la baie de raisin.

RADLER (1968) et KOLATTUKUDY (1970) remarquent que la longueur de la chaîne carbonée des alcools primaires libres et estérifiés est du même ordre de grandeur pour les cires de pois et de raisin. Cette conclusion ne semble pas valable pour la prune d'Ente.

De même que les alcools primaires, les acides à longue chaîne avec un nombre pair de carbone prédominent, les plus importants quantitativement étant les acides en C_{28}, C_{16}, C_{18}, C_{26} et C_{24}. L'acide oléique, possédant une double liaison, est en proportion notable : 10 p. 100 en moyenne de la fraction acide totale.

Contrairement aux alcools primaires et aux acides gras, les hydrocarbures et les alcools secondaires principaux ont une chaîne à nombre impair de carbone, le composé à 29 atomes de carbone étant présent en grande quantité.

Le nonacosane signalé par plusieurs auteurs (MAZLIAK, 1963 ; HOLLOWAY, 1967 ; LASETTER *et al.*, 1968 ; IVANO et ANGHELOVA, 1969 ; WOLLRAB, 1969) représente plus de 88 p. 100 des hydrocarbures saturés de la cire de prune d'Ente.

Le nonacosane-10-ol se retrouve dans la même proportion pour les alcools secondaires mis en évidence dans la cire de prune. Ce dernier composé a été peu souvent cité ; CHIBNALL *et al.* (1931) le trouvent dans la cire de pomme et WOLLRAB (1969) dans celle de l'aubépine.

La présence d'heptacosane-8-ol notée ici n'a, à notre connaissance, pas été trouvée dans d'autres végétaux.

KOLATTUKUDY *et al.* (1970) ont pu montrer, dans le chou, à l'aide de précurseurs radioactifs l'interconversion : nonacosane → nonacosane-15-ol → nonacosane-15-one, c'est-à-dire, la relation biosynthétique générale : hydrocarbure → alcool secondaire → cétone.

Malgré toutes les précautions prises dans l'extraction de la cire de prune d'Ente, il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence de cétone. La relation métabolique deviendrait alors : nonacosane → nonacosane-10-ol.

L'absence de cétone et la forte proportion d'alcool secondaire par rapport à l'hydrocarbure pourrait être expliquée par l'absence d'enzyme oxydatif, l'alcool secondaire étant, de ce fait, un composé final.

V. — CONCLUSION

Parmi les nombreux constituants de la cire cuticulaire de la prune d'Ente, ont pu être mis en évidence des hydrocarbures, des alcools primaires, des alcools secondaires, des acides gras, des stérides, des esters et l'acide oléanolique ; on peut noter

aussi la présence de glycérol. Toutefois, un certain nombre de constituants reste à identifier ; en particulier, il faudrait préciser la nature des composés dans lesquels est engagé le glycérol.

L'absence d'aldéhyde et de cétone semble caractériser, dans une certaine mesure, la composition de cette cire.

Reçu pour publication en mai 1972.

SUMMARY

COMPOSITION OF THE CUTICULAR WAX OF PLUMS (VARIETY « D'ENTE »)

The cuticular wax of grafted plums plays a very important role during dehydration of the fresh fruit to obtain prunes (Agen prunes) and knowledge of its composition permits rational intervention to reduce the duration of the drying time.

An average of 190 µg total wax par cm² epiderme of the fruit is extracted with chloroform. The initial separation into six fractions of constituent parts was carried out by chromatography on thin layers ; the more accurate determination of the elements in each family or group being carried out by gas-liquid chromatography, infrared spectroscopy or by means of mass spectrometry.

Hydrocarbons, sterids, esters, fatty acids, primary and secondary alcohols, glycerol and a triterpenic acid, oleanolic acid, were shown ; on the other hand, neither aldehyde nor cetone were found, which are encountered in the wax of other fruits.

RESUMEN

COMPOSICION DE LA CERA CUTICULAR DE LA CIRUELA DE ENTE

La cera cuticular de la ciruela de Ente desempeña un papel sumamente importante durante la deshidratación del fruto fresco para la obtención de la ciruela pasa y el conocimiento de su composición permitiria intervenir racionalmente para reducir la duración del secado.

Mediante empleo de cloroformo, se extran 190 µg de cera total, en promedio, por cm² de epidermia de fruto. La separación inicial en seis fracciones de componentes ha sido efectuada por cromatografia en capa fina. Las determinaciones más precisas de los elementos en cada familia o grupo se llevan a cabo por cromatografia en fase gaseosa, por espectroscopia infrarroja o por espectrometria de masa.

Se han podido hacer resaltar los hidrocarburos, los estéridos, los esteres, los ácidos grasos, los alcoholes primarios y secundarios, el glicerol y un ácido triterpénico : el ácido oleanólico. Contrariamente, no se han encontrado aldehidos ni cetonas, existentes en otras ceras de frutos.

RIASSUNTO

COMPOSIZIONE DELLA CERA CUTICOLARE DELLA PRUGNA D'ENTE

La cera cuticolare della prugna d'Ente ha un ruolo molto importante durante la disidratazione del frutto fresco per l'ottenimento della prugna secca e la conoscenza della sua composizione permetterebbe d'intervenire razionalmente per ridurre il tempo di essiccazione.

Si estrae, mediante chloroformio, 190 µg di cera totale, in media, per cm² di epidermide di frutto. La separazione iniziale in 6 frazioni di componenti è stata effettuata mediante cromatografia su strato sottile poichè le determinazioni più precise degli elementi di ogni famiglia o di ogni gruppo si ottengono mediante cromatografia in fase gassosa, spettroscopia infrarossa o spettrometria di massa.

Si son potuti mettere in evidenza degli idrocarburi, delle sterine, degli esteri, degli acidi grassi, degli alcooli primari e secondari, del glicerolo e un acido triterpenico : l'acido oleanolico. Non si sono trovati invece, nè aldeidi, nè chetoni già incontrati in altre cere di frutta.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. P. Dubois de la Station de Technologie des Produits végétaux de Dijon pour l'identification de composés par spectrométrie de masse.

Nos remerciements vont également au Bureau interprofessionnel du Pruneau de Villeneuve-sur-Lot pour sa participation à cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brieskorn C. H., Klinger H., 1963. Chemical composition of apple peel. II.-Composition of apple peel triterpenes. *Z. Lebensmittel Unters. u. Forsch.*, **120** (4), 269-273.

Brieskorn C. H., Reinartz H., 1967. Composition of tomato peel. I.-The extractable components. *Z. Lebensmittel Unters. u. Forsch.*, **133** (3), 137-141.

Chibnall A. C., Piper S. M., Pollard A. B., Smith J. A., Williams E. F., 1931. The wax constituents of apple cuticule. *Biochem. J.*, **25**, 2095-2110.

Grncarevic M., Radler F., 1967. The effect of wax components on cuticular transpiration model experiments. *Planta*, **75**, 23-27.

Holloway P. J., 1967. *Studies of the wettability of leaf surfaces.* Ph. D. Thesis, University of London.

Holloway P. J., 1966. Thin-layer chromatography in the study of natural waxes and their constituents. *J. Chromatogr.*, **25**, 336-346.

Ivano C. P, Dodova-Anghelova M. S., 1969. Étude comparée de la composition des paraffines de la cire cuticulaire de différentes variétés de pomme. *C. R. Acad. Sci. bulgare*, **22**, 7.

Kolattukudy P. E., 1970. Composition of the surface lipids of pea leaves (*Pisum sativum*). *Lipids*, **5** (4), 398-402.

Kolattukudy P. E., Tsui-Yun 1970. Direct evidence for biosynthetic relationships among hydrocarbons, secondary alcohols and ketones in *Brassica oleracea*. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **41** (6), 1369-1374.

Lasetter J. L., Weber D. Y., Oro J., 1968. Characterization of cabbage leaf lipids : *n*-alkans ketone and fatty acids. *Phytochemistry*, **7**, 1005-1008.

Markley K. S., Sando C. E., 1934. Petroleum ether and ether- soluble constituents of cranberry pomace. *J. biol. Chem.*, **105**, 643-653.

Mazliak P., 1963. *La cire cuticulaire des pommes* (*Pirus malus* L.).Thèse de Doctorat ès-sciences naturelles, Université de Paris.

Power F. B., Moore C. W., 1910. The constituents of the leaves of *Prunus serotina*. *J. Chem. Soc.* **97**, 1099-1112.

Radler F., 1965. Reduction of loss of moisture by the cuticule wax components of grapes. *Nature*, London, **207**, 1002-1003.

Radler F., 1968. La cire cuticulaire des grains de raisin et des feuilles de la vigne. *Connaissance Vigne Vin* (3), 271-294.

Radler F., Horn D. M. S., 1965. The composition of grape cuticle wax. *Austral. J. Chem.*, **18**, 1059-1069.

Randerath K., 1964. *Chromatographie sur couches minces*, 171. Gauthier-Villard, Paris.

Sosa A., 1950. Sur la composition chimique d'une Éricacée méditerranéenne, l'*Arbustus unedo* L. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **32**, 344-356.

Sivadjian J., 1968. Les inhibiteurs chimiques de la transpiration végétale.Rôle de la cire cuticulaire. *C. R. Acad. Sci.*, **266**, série D, 353-355.

Van Die J., Soemarsono R., 1957. The wax layer of the fruit of *Fagraea borneensis*. *Ann. bogor.* **2**, 225-231.

Waldi D., 1965. In *Thin-layer chromatography*, 485-502, Academic Press, New York.

Wollrab V., 1969. Secondary alcohols and paraffins in the plant waxes of the family rosaceae. *Phytochemistry*, **8**, 623-627.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 35-46.

MÉTHODE DE VINIFICATION PAR MACÉRATION CARBONIQUE

VII. — Influence de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité des vins doux naturels élaborés a partir de *grenache* noir

P. BÉNARD, C. FLANZY, M. BOURZEIX, S. AUBERT et P. FERRY,
avec la collaboration technique de M. Sabatier, F. Lapize, P. Perry et A. Solano

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A.,
11104 Narbonne

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84 - Montfavet

RÉSUMÉ

Les auteurs étudient l'influence de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité des Vins Doux Naturels de *Grenache* noir élaborés selon cette méthode.

Les essais poursuivis pendant trois années portent sur des lots de 300 à 400 kg de vendange et sont conduits en cuves métalliques thermorégulées de 6 hl. Trois températures et trois durées de macération sont testées.

Cette technique peut permettre l'élaboration de Vins Doux Naturels de bonne qualité organoleptique. Contrairement aux résultats obtenus pour les vins rouges secs ou les vins blancs secs, la dégustation ne permet pas de déterminer une température et une durée de macération optimales. Le vinificateur doit choisir ces deux paramètres en fonction du type de vin recherché.

Les Vins Doux Naturels de macération carbonique présentent parfois des anomalies dans les valeurs du rapport P/α.

Mots clés : *macération carbonique, qualité, Vins Doux Naturels.*

INTRODUCTION

L'élaboration de Vins Doux Naturels ou de Vins de Liqueur [1] par macération carbonique a fait l'objet d'expérimentations discontinues depuis 1934. Les essais ont nettement mis en évidence l'intérêt que présentait cette technique à l'égard de

[1] VDN = Vin Doux Naturel selon la législation française (Flanzy, 1959 *a*).
VDL = Vin de Liqueur — — — — —

la qualité organoleptique des Vins Doux Naturels (FLANZY, ANDRÉ, BÉNARD, 1953 ; FLANZY, 1959 *b*). Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs (BRUGIRARD, ROQUES, DIXONNE, 1970).

Nous désirons, actuellement, préciser les conditions optimales de température et de durée de macération carbonique pour chaque type de vin : Vin Doux Naturel et Vin de Liqueur de *Grenache* noir. Le travail présenté dans ce mémoire porte sur les expérimentations effectuées au domaine de Pech-Rouge, I. N. R. A. (Aude) en 1967, 1968 et 1969.

TECHNIQUES

Protocole expérimental

Une vendange de *Grenache* noir, provenant de la même vigne pour les trois années d'expérimentation, est répartie en lots identiques selon la technique de BÉNARD et JOURET (1963).

Chaque lot destiné à subir une macération carbonique est déversé, sans foulage préalable, dans une cuve de 6 hl en acier émaillé dont l'atmosphère est constituée en majeure partie par du CO_2. La cuve est située dans une enceinte thermorégulée. A la fin de la durée choisie de macération carbonique et après pressurage, le mélange des jus de goutte et de presse fermente, à une température déterminée (tabl. 1). Au cours de cette fermentation complémentaire, une partie aliquote du moût est prélevée à la densité voulue et mutée à l'éthanol 96°GL (10 p. 100 V/V). Le moût restant en cuve sert à l'élaboration de vins secs (FLANZY, BÉNARD, AUBERT, 1970).

TABLEAU I

Caractéristiques des vinifications

Année	Numéro de cuve	Poids vendange (kg)	Température macération ou chauffage (°C)	Durée macération ou chauffage	Température de la fermentation complément. en phase liquide (°C)	Densité mutage à 15°C
1967	1	350	35	6 jours	20-22	1,048
	2	—	35	10 —	—	1,042
	3	—	25	6 —	—	1,047 5
	4	—	25	11 —	—	1,044
	5	—	15	7 —	—	1,046
	6	—	15	12 —	—	1,047 5
1968	7	330	35	6 jours	35	1,047
	8	—	35	11 —	35	1,043
	9	—	25	11 —	25	1,045
	10	—	15	12 —	15	1,037
	11	—	15	19 —	15	1,046
1969	12	400	35	5 jours	35	1,030
	13	325	25	6 —	25	1,035 5
1969	14	1 130	70 chauffage	90 s + 30 mn chambrage	20-25	1,035

En 1969, 30 p. 100 de la vendange utilisée sont altérés par la pourriture grise. Deux échantillons sont traités par macération carbonique. Un troisième échantillon destiné à comparer les techniques d'élaboration a été éraflé, foulé puis chauffé à 70°C durant 90 s. Après un maintien de 30 mn à 65°C, le moût est refroidi à 20°C et mis à fermenter dans une cuve de 6 hl. Le mutage a lieu dans les mêmes conditions que celles réalisées pour les échantillons de macération carbonique.

Les caractéristiques des vinifications sont résumées dans le tableau 1. Trois températures de macération (15°, 25°, 35°C) sont étudiées ; deux durées de macération sont testées pour chaque température.

Analyses. Dégustation

Les analyses et la dégustation sont réalisées, après deux soutirages, dans l'année suivant les vendanges.

Les analyses des vins sont effectuées selon les méthodes officielles (*Journal officiel*, 1963, *63*, 154). Des chromatographies de sucres sont pratiquées sur les échantillons de 1968, d'après la méthodologie Technicon (Bonnafé, 1968).

Les jurys de dégustation sont formés d'œnologues, de techniciens et de négociants des régions productrices de VDN. Chaque dégustateur classe les échantillons les uns par rapport aux autres par une appréciation globale incluant tous les critères de dégustation. Les classements sont traités statistiquement selon la méthode de Kramer (Amerine, Pangborn, Roessler, 1965).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. — *Composition analytique des vins* (tabl. 2)

Les vins élaborés en 1967 correspondent à la définition des VDN. En revanche, les vins de 1969 entrent dans la catégorie des VDL (tabl. 1), le moût initial titrant moins de 14°GL en puissance.

Les extraits secs totaux des vins de 1967 et 1968 présentent des valeurs normales alors que les teneurs des vins de 1969 sont nettement inférieures aux limites habituelles des VDN (Brugirard, Roques, 1967).

Le degré alcoolique acquis diminue avec la durée de macération pour 35° et 25°C. Il en est de même à 15°C lorsque la macération se prolonge au-delà de 12 jours.

Pour des périodes de 6 à 8 jours de macération carbonique, la quantité d'alcool acquis croît avec la température. Ce résultat est conforme aux observations antérieures relatives à la production d'éthanol au cours de la fermentation intracellulaire des raisins (Flanzy, André, 1965 ; Jouret, 1971).

Les quantités de sucres résiduels en 1967 et 1968 se situent dans la fourchette moyenne établie par Brugirard et Roques (1967).

Les vins obtenus entrent dans la catégorie des VDN ou des VDL demi-doux ou demi-secs. Dans tous les cas, le mutage des moûts ne provoque pas un arrêt immédiat des fermentations. Cette difficulté d'inhiber l'activité des levures a déjà été mise en évidence au cours de vinification de muscats par macération carbonique (Flanzy, André, Bénard, 1953 ; Schober, 1969). Ainsi, la densité de mutage souhaitable pour un type de vin donné ne peut encore être déterminée d'une façon précise. Ce phénomène de résistance des levures aux teneurs relativement élevées d'éthanol peut s'expliquer par l'enrichissement du milieu en éléments biotiques au

TABLEAU 2

Composition analytique des vins

Année	N° cuve	Densité 15°C	Alcool acquis	Sucres (g/l)	Alcool total	P/α 15°C	Extrait sec (g/l)	Cendres (g/l)	Alcalinité des cendres (méq./l)	Potassium (méq./l)	Sodium (méq./l)	Calcium (méq./l)	Ac. tartrique (méq./l)	Acid. totale H_2SO_4 (méq./l)	Ac. volatile H_2SO_4 (méq./l)	pH	Glycérol (g/l)	Acétaldéhyde (méq./l)
	1	1,014 8	17° 70	73	21° 90	2,14	96,40	2,95	30	43	2,7	3,3	19	34,7	4,3	4,2	6,808	52,8
1967	2	1,025 6	16° 20	95	21° 75	4,24	117,60	3,33	35	47,1	2,6	3,1	23	34,7	3,7	4,3	6,072	52,8
après	3	1,016	17° 65	79	22° 20	2,32	100,40	2,85	24	39,4	2,5	3,1	17,6	42,9	4,5	4,1	7,084	51
2 soutirages	4	1,022 1	16° 35	90	21° 55	2,31	111,00	3,15	32,5	42,5	2,6	3,3	22	34,7	4,7	4,2	6,072	52,8
janvier 1968	5	1,022 9	16° 90	94	22° 35	2,56	113,80	2,65	32	33,8	2,6	3,4	20	44,9	2,4	3,9	6,348	72,1
	6	1,019 9	17° 35	89	22° 50	2,78	106,90	2,88	28,5	36,4	2,4	3,1	19	36,7	2,9	4,1	4,784	70,4
	7	1,021	17° 65	87	22° 73	2,69	116,80	2,55	27	32,3	2,3	3	20	53,0	4,1	4,05	5,796	65,2
1968	8	1,017 2	17° 35	77	21° 82	4,90	105,00	2,88	26,5	32,3	2,6	2,4	24	40,8	6,1	4,12	5,336	35,2
après	9	1,016 8	18° 10	82	22° 88	4,87	106,30	2,85	28,8	33	2,8	2,4	20	40,8	6,1	4,20	5,612	31,7
2 soutirages	10	1,014 4	18° 60	73	22° 86	2,69	103,40	2,58	24,3	27,7	2,3	2,9	22	46,9	3,1	3,98	6,624	58
mai 1969	11	1,014 9	17° 85	74	22° 15	3,39	103,00	2,55	25,5	31,2	2,4	2,6	20	46,9	6,1	4,00	6,072	12,3
1969	12	1,005 4	17° 60	45	20° 20	3,16	69,30	2,76	34	32,8	4,1	0,9	24	55,1	5,3	3,78	8,00	26,4
après	13	1,005 1	17° 60	47	20° 31	3,34	70,50	2,80	35	34,3	3,5	0,7	20	49,0	7,8	3,90	8,46	26,4
soutirage	14	1,008 9	17° 65	50	20° 56	1,62	78,80	2,40	34	29,2	4,8	1,2	20	66,3	4,3	3,65	8,64	31,6
janvier 1970																		

cours de la fermentation intracellulaire des raisins (BARRE, 1971 ; BRÉCHOT, CHAUVET, 1971).

Le degré alcoolique total (acquis + puissance) tend à s'abaisser lorsque la température et la durée de macération croissent.

Glycérol et acétaldéhyde ont des valeurs moyennes ou faibles selon les normes déjà citées (BRUGIRARD, ROQUES, 1967). La teneur en glycérol diminue avec le temps de macération carbonique.

Le rapport P/α (P = poids de sucre total ; α = déviation polarimétrique) croît avec la durée de macération et avec la température lorsque cette dernière s'exerce durant une période de 10 à 12 jours. Au contraire, pour une durée de macération limitée à 6 ou 7 jours, P/α diminue lorsque la température augmente.

Les valeurs de P/α sont moyennes ou fortes pour de faibles durées de macération et elles sont fortes pour de longues durées. Les analyses chromatographiques réalisées sur les essais de 1968 (tabl. 3) donnent des pourcentages respectifs de glucose et de fructose parfois différents de ceux, théoriques, calculés d'après la table de Blarez (RIBÉREAU-GAYON, PEYNAUD, 1958). Ainsi, les pourcentages mesurés de fructose sont toujours plus élevés que ne le laisseraient prévoir les valeurs correspondantes déduites de P/α.

TABLEAU 3

Pourcentages de glucose et de fructose dans les vins de 1968

Numéro cuve	P/α	Chromatographie p. 100		Table Blarez p. 100	
		Fructose	Glucose	Fructose	Glucose
7	2,69	66	34	63,5	36,5
8	4,90	56	44	51	49
9	4,87	62	38	51	49
10	2,69	66	34	63,5	36,5
11	3,39	62	38	58	42

Les VDN obtenus après macération carbonique peuvent donc présenter des rapports P/α anormalement élevés. Ils sortent ainsi des limites généralement admises pour les vins de ce type sans, pour autant, que leur élaboration ait enfreint les règles légales (SUDRAUD, CASSIGNARD, 1968).

Cette observation est importante car elle impose une révision de la législation sur la valeur de P/α dans le cas des Vins Doux Naturels de macération carbonique. Une telle exception à la règle de P/α n'est d'ailleurs pas unique. Plusieurs auteurs ont précisé certaines conditions dans lesquelles les vins peuvent avoir, naturellement, des valeurs de P/α très élevées (FLANZY, ANDRÉ, BÉNARD, 1953 ; BAILLOT D'ESTIVAUX, 1970 ; BRUGIRARD, ROQUES DIXONNE, 1970).

2. — *Intensité colorante et matières polyphénoliques des vins* (tabl. 4 et 5)

D'une façon générale, les VDN de macération carbonique présentent des indices d'intensité colorante I (DO 520/420), de chromophores rouges (DO 520) et d'équilibre de composition A $\left(\frac{\text{DO 520}}{\text{DO 280}}\right)$ supérieurs à ceux des vins secs correspondants (Flanzy, Bénard, Aubert, 1970). En revanche, leurs teneurs en matières tannoïdes, évaluées par les DO 280 nm, sont plus faibles que celles des vins secs.

TABLEAU 4

Intensité colorante et matières tannoïdes des vins

Année	Numéro cuve	DO·10⁻³ 520 nm	DO·10⁻³ 420 nm	DO·10⁻³ 280 nm	I DO (520 + 420)	T $\frac{\text{DO 520}}{\text{DO 420}}$	A $\frac{\text{DO 520}}{\text{DO 280}}$
1967	1	546	462	488	1 008	1,182	1,119
	2	620	510	617	1 130	1,216	1,005
	3	254	240	328	494	1,058	0,774
	4	562	463	560	1 025	1,214	1,004
	5	146	160	225	308	0,913	0,649
	6	250	240	330	490	1,042	0,758
1968	7	265	255	585	520	1,039	0,453
	8	510	410	1 090	920	1,243	0,468
	9	482	422	924	904	1,142	0,522
	10	192	180	475	372	1,066	0,404
	11	283	263	697	546	1,076	0,406
1969	12	162	97	830	259	1,670	0,195
	13	122	77	700	199	1,584	0,174
	14	182	79	665	261	2,304	0,274

L'intensité colorante, la teinte rouge et les matières tannoïdes des VDN croissent avec la température et la durée de macération carbonique. L'étude du tableau 5 révèle l'influence de ces deux facteurs sur la composition polyphénolique des vins. Ainsi, le passage de la température de macération de 15° à 35°C entraîne, pour une durée semblable de 6 à 7 jours, une augmentation de 274 p. 100 pour la DO 520 et de 227 p. 100 pour l'intensité colorante contre 117 p. 100 pour les matières tannoïdes. Le pourcentage d'augmentation des DO 520 est alors 2,34 fois plus élevé que celui des matières tannoïdes ; de même, ce facteur de multiplication de l'intensité colorante par rapport aux tannoïdes est de 1,94. Autrement dit, nous observons une augmentation très sensible des colorants par rapport aux tanins.

Le passage de 15° à 25°C donne seulement des facteurs de multiplication respectifs de 1,61 et 1,30. Dans ces conditions, les vins seront d'autant plus colorés et, proportionnellement, d'autant moins tanniques que la température sera plus élevée.

TABLEAU 5

Étude de l'évolution des composés phénoliques des vins

Facteur durée de macération									Facteur température de macération				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Année	θ °C	Durée jours	Numéro cuve	p. 100 A DO 520	F 520/280	p. 100 A DO 280	F I/280	p. 100 A I	p. 100 A DO 520	F 520/280	p. 100 A DO 280	F I/280	p. 100 A I
1967	35	6	1	14	0,54	26	0,46	12	274	2,34	117	1,94	227
	35	10	2						118	1,36	87	1,51	131
	25	6	3	121	1,70	71	1,52	108	74	1,61	46	1,30	60
	25	11	4						85	1,21	70	1,56	109
	15	7	5	71	1,51	47	1,26	59	0		0		0
	15	12	6						0		0		0
1968	35	6	7	92	1,1	86	0,90	77					
	35	11	8						166	1,28	130	1,06	147
	25	11	9						151	1,59	95	1,51	143
	15	12	10	47		47		47	0		0		0
	15	19	11		1		1						
1969	35	5	12						33	1,74	19	1,58	30
	25	6	13						0		0		0

Colonnes 5-7-9 : Les p. 100 d'augmentation (p. 100 A) des DO 520, 280 et I sont calculés pour une même température et entre deux durées de macération.

Colonnes 10-12-14 : Les p. 100 d'augmentation des DO 520, 280 et I sont calculés pour une même durée de macération (5 à 7 jours et 10 à 12 jours) et pour deux températures, par rapport aux DO correspondantes obtenues à 15°C

Colonnes 6-8-11-13 : Les facteurs de multiplication (F) sont obtenus en rapportant les p. 100 d'augmentation des DO 520 et I aux p. 100 d'augmentation de DO 280.

$$F\,\frac{I}{280} = \frac{\text{p. 100 d'augmentation I}}{\text{p. 100 d'augmentation DO 280}}.$$

$$F\,\frac{520}{280} = \frac{\text{p. 100 d'augmentation DO 520}}{\text{p. 100 d'augmentation DO 280}}.$$

$$I = \text{DO 520 nm} + \text{DO 420 nm}.$$

Cette proposition risque d'être infirmée lorsque la durée de macération est portée à 10-12 jours, comme le montrent les résultats de 1968. En effet, les facteurs de multiplication entre 15 et 25°C sont supérieurs à ceux obtenus entre 15° et 35°C.

L'examen des résultats par comparaison des données entre deux durées de macération met en évidence l'intérêt que peut avoir un allongement de la durée pour la production de vins plus colorés et, proportionnellement, moins tanniques.

A 25°C, la prolongation de la macération carbonique de 6 à 11 jours permet d'obtenir des facteurs de multiplication nettement supérieurs à l'unité : 1,70 et 1,52 pour, respectivement, la DO 520 et l'intensité colorante. A 35°C, ces facteurs de multiplication sont inférieurs à 1. Un allongement de la durée à cette température semble donc à proscrire.

En conclusion, le vinificateur désireux d'obtenir des vins de couleur rouge soutenue pourra réaliser une macération soit à haute température (35°C) pendant une courte durée (6 jours), soit à température plus basse (25°C) durant une période prolongée (10 à 12 jours).

3. — *Dégustation* (tabl. 6)

Les dégustateurs reconnaissent unanimement la très bonne qualité de tous les vins présentés. Chacun de ces derniers possède une originalité et correspond à un type précis de VDN. De ce fait, un échantillon est plus ou moins apprécié selon les goûts personnels du dégustateur. Dans de telles conditions, et comme le montre l'étude statistique des résultats, il n'apparaît pas de préférence significative pour un type de vin donné. En effet, si en 1967 le vin issu d'une macération carbonique de 12 jours à 15°C est supérieur à l'ensemble des autres, en 1968 l'échantillon élaboré par macération de 6 jours à 35°C obtient le plus de suffrages.

En janvier 1970, des négociants dégustent les vins de 1969 : les échantillons de macération carbonique sont préférés alors à celui de vendage chauffée ; le lot à 35°C, assimilé à un grand Porto, présentait un arôme plus développé que les deux autres. A l'épreuve de juin 1970 les vins de 35°C et de chauffage de la vendange sont jugés supérieurs à celui de 25°C. Ces résultats montrent que de très bons vins peuvent être élaborés par macération carbonique ou par chauffage de la vendange à partir de raisins altérés ; cela s'est confirmé dans des essais ultérieurs (Bénard, Flanzy, 1971).

Pour les professionnels, les VDN de macération carbonique semblent d'autant plus complets et plus aptes à vieillir que la température de macération a été plus élevée et la macération de plus longue durée. Les vins élaborés à 15°C doivent être bus jeunes.

CONCLUSION

La technique de vinification par macération carbonique peut permettre l'obtention de Vins Doux Naturels de haute qualité organoleptique.

Dans l'élaboration de tels vins, la température de la macération carbonique revêt une grande importance. En effet, le niveau de cette température et sa durée d'action influent fortement tant sur les caractères analytiques qu'organoleptiques du produit final.

TABLEAU 6

Dégustations

Année	Date de dégustation	Nombre total dégustateurs	Numéro cuve	Nombre de dégustateurs ayant classé un vin dans un rang donné. (Rang de classement du meilleur (1er) au moins bon)						Total de points	Kramer niveaux seuil signific. 5 p. 100
				1er	2e	3e	4e	5e	6e		
1967	14-5-68	11	1		1	2	4	2	2	46	25-52
			2	2	2		3	2	2	40	
			3	1	2	2	2	3	1	40	
			4	3	4	1	2	1		27	29-48
			5	3	1	1	1	1	4	41	
			6	4	2	4	1			24	
1968	6-69	8	7	6	1		1			12	
			8		4	3	1			21	15-33
			9		3	1	2	2		27	17-31
			10	1	3	3	1			20	
			11	1		1	1	5		33	
1969	6-70	9	12	5	4					13	13-23
			13	2	3	5				25	14-22
			14	4	2	3				17	

Interprétation

1967 : Les vins sont classés par chaque dégustateur du meilleur (1re colonne) au moins bon.
Au seuil de signification de 5 p. 100, d'après la table de Kramer, l'échantillon 6 est supérieur à l'ensemble des traitements. Les autres ne sont pas différents.

1968 : Au seuil de signification de 5 p. 100, d'après la table de Kramer, l'échantillon 7 est supérieur à l'ensemble des traitements. Les autres ne sont pas différents.

1969 : Au seuil de signification de 5 p. 100, d'après la table de Kramer, l'échantillon 13 est inférieur aux deux autres qui ne sont pas différents.

Si la majorité des dégustateurs préfère les vins issus d'une macération carbonique conduite à température relativement élevée (35°C), il existe cependant un nombre non négligeable d'amateurs de vins élaborés à température plus réduite (25 et 15°C).

Aussi, alors que nous avons pu préconiser une température de macération de 35°C pour l'obtention de vins secs de *Grenache* (FLANZY, BÉNARD, AUBERT, 1970), nous devons être plus nuancés dans le cas des VDN ; chaque œnologue doit choisir la température et la durée de macération carbonique correspondant au type de produit souhaité.

Une règle peut néanmoins être proposée : pour une température de macération élevée (35°C) la durée d'action de cette température devra être brève (6 jours) si le vinificateur désire obtenir un vin proportionnellement plus coloré que tannique.

Il convient de souligner que les VDN de macération carbonique, élaborés sans pratiques frauduleuses, sortent souvent des normes relatives au rapport P/α.

Certains aspects de la conduite de cette vinification restent encore obscurs, comme la détermination du point de mutage lorsque le VDN recherché est du type doux. Des études sur ces problèmes sont en cours.

Rçeu pour publication en mai 1972.

SUMMARY

WINE-MAKING BY CARBONIC MACERATION. VII. — INFLUENCE OF TEMPERATURE AND DURATION OF CARBONIC MACERATION ON THE QUALITY OF FORTIFIED FRENCH WINES (« VINS DOUX NATURELS ») PREPARED FROM BLACK *GRENACHE*

The authors are studying the influence of temperature and duration of carbonic maceration on the quality of fortified french wines (« Vins Doux Naturels ») prepared from black *Grenache* by means of this method.

The assays, carried out over a three-years period, concern 300-400 kg lots of grapes and are conducted in thermoregulated metallic vats of 6 hl. Three temperatures and three durations are tested.

This technique permits the preparation of fortified french wines of a good organoleptic quality. Contrary to the results obtained for dry red and dry white wines, optimal temperature and maceration duration cannot be determined by testing. The wine grower must choose these two parameters in terms of the type of wine desired.

The fortified french wines of carbonic maceration sometimes present anomalies in the values of the P/α proportion.

RESUMEN

METODO DE VINIFICACION POR MACERACION CARBONICA VII. — INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y DE LA DURACIO DE LA MACERACION CARBONICA SOBRE LA CALIDAD DE LOS VINOS DULCES NATURALES ELABORADOS MEDIANTE *GRENACHE* NEGRA

Los autores estudian la influencia de la temperatura y de la duración de la maceración carbónica sobre la calidad de los Vinos Dulces Naturales de *Grenache* negra, elaborados segun dicho método.

Los ensayos proseguidos durante tres anos se refieren a partidas de 300-400 kg de vendimia y se han efectuado en cubas metálicas termorreguladas de 6 hl. Los ensayos se han efectuado utilizando très temperaturas y tres duranciones de maceración.

Esta técnica puede permitir la elaboración de Vinos Dulces Naturales de buena calidad organoléptica. Contrariamente a los resultados obtenidos para los vinos tintos secos o los vinos blancos secos, la degustación no permite determinar una temperatura y una duración de maceración óptimas. El vinificador deberá optar entre estos dos parámetros en función del vino que se trata de obtener.

En ciertos casos, los Vinos Dulces Naturales de maceración carbónica presentan anomalias en los valores de la relación P/α.

RIASSUNTO

METODO DI VINIFICAZIONE MEDIANTE MACERAZIONE CARBONICA VII. — INFLUENZA DELLA TEMPERATURA E DELLA DURATA DELLA MACERAZIONE CARBONICA SULLA QUALITA' DEI VINI DOLCI NATURALI ELABORATI A PARTIRE DAL *GRENACHE* NERO

Gli autori studiano l'influenza della temperatura e della durata della macerazione carbonica sulla qualità dei Vini Dolci Naturali di *Grenache* nero, elaborati secondo questo metodo.

Le prove condotte durante tre anni su dei lotti da 300 a 400 kg d'uva sono effettuate in vasche metalliche termoregolate di 6 hl. Sono verificate tre temperature e tre durate di macerazione.

Questa tecnica puo' consentire l'elaborazione dei Vini Dolci Naturali di buona qualità organolettica. La degustazione non permette di determinare una temperature e una durata di macerazione ottimali come è, invece, il caso per i risultati ottenuti per i vini rossi secchi o i vini bianchi secchi. Il vinificatore deve scegliere queste due parametri in funzione del tipo di vino desiderato.

I Vini Dolci Naturali mediante macerazione carbonica presentano talvolta anomalie nei valori del rapporto P/α.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amerine M. A., Pangborn R. M., Roessler D. B., 1965. *Principles of sensory evaluation of food.* 351-353. Academic Press, New York.

Baillot D'Estivaux L., 1970. Étude critique du rapport P/α. Son interprétation dans l'expertise des vins blancs. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **689**, 10-18.

Barre P., 1971. Rendement en levure des jus de macération carbonique. In Compte Rendu *Journées Macération Carbonique*, 120-121, I. N. R. A., 84 - Montfavet.

Bénard P., Jouret C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 85-102.

Bénard P., Flanzy C., 1971. La vinification des Vins Doux Naturels et des Vins de Liqueur par chauffage de la vendange. *Bull. techn. Pyr.-Orient.*, **53**, 25-29.

Bonnafé M., 1968. *Cours Technicon.* Cie Technicon, Paris.

Bréchot P., Chauvet J., 1971. Phénomènes microbiologiques observés au cours de la vinification beaujolaise par macération carbonique. In Compte Rendu *Journées Macération Carbonique*, 106-119, I. N. R. A., 84 - Montfavet.

Brugirard A., Roques J., 1967. In *Fermentations et vinifications*, 2e *Symposium d'Œnologie.* Vol. 2, 509-527, I. N. R. A., Paris.

Brugirard A., Roques J., Dixonne M., 1970. L'amélioration de la qualité des Vins Doux Naturels. *Rev. Fr. Œnol.*, **38**, 16-31.

Flanzy M., André P., Bénard P., 1953. La vinification en Vins Doux Naturels du cépage *Muscat.* (Données non publiées).

Flanzy M., 1959 *a*. Élaboration des vins spiritueux doux (Vins Doux Naturels). Réglementation et alcoolisation. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 81-100.

Flanzy M., 1959 *b*. Recherches sur la vinification des Vins Doux Naturels. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 285-320.

FLANZY C., ANDRÉ P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 173-178.

FLANZY C., BÉNARD P., AUBERT S., 1970. Méthode de vinification par macération carbonique. IV. -Influence de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité des vins secs élaborés à partir de *Grenache* noir. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 29-40.

JOURET C., 1971. Produits principaux et secondaires de la fermentation intracellulaire des raisins. In Compte rendu *Journées Macération carbonique*, 29-36, I. N. R. A., 84 - Montfavet.

MUJDABA F., DOINA VASILESCU., 1971. Considérations sur la variation du rapport P/α dans les vins demi-secs et doux. *Rev. Hortic. Vitic.*, **20**, 42-49.

SCHOBER A., 1969. La vinification du muscat des Beaumes de Venise (communication personnelle).

SUDRAUD P., CASSIGNARD R., 1968. Le rapport P/α dans les vins blancs liquoreux du Bordelais. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **263**, 332-340.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 47-67.

DÉTERMINATION DE LA PEROXYDASE DANS LE RAISIN

C. POUX et Andrée OURNAC (†)
avec la collaboration technique de J.-L. Batlle

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A.,
11104 Narbonne

RÉSUMÉ

Une technique d'extraction et de mesure d'activité de la peroxydase du raisin est proposée.

L'extraction est réalisée sur un lot de 100 baies de raisin aussi homogène que possible. On broie dans un mixer en verre 30 secondes à 8 000 tr/mn, puis 30 secondes à 12 000 tr/mn et on centrifuge à 4°C à 1 475 *g* pendant 2 minutes.

L'extraction de l'enzyme est meilleure si on opère en milieu neutre ou même alcalin et si on le protège, par 1 gramme de polyvinylpyrrolidone, de l'action inhibitrice des matières tannoïdes.

Pour mesurer l'activité de la peroxydase, à 10 ml de tampon acétique 0,1 M à pH 5 on ajoute 1 ml de peroxyde d'hydrogène 0,05 M et 1 ml de solution 0,39 M d'orthophénylènediamine (550 mg dans 10 ml d'eau + 3 ml d'éthanol à 95°GL). Après agitation, on ajoute 1 ml de préparation enzymatique convenablement diluée. On lit la densité optique à 420 nm toutes les 30 secondes pendant 10 à 15 minutes. Dans l'essai à blanc, on remplace le peroxyde d'hydrogène par de l'eau distillée.

L'emploi de l'acide ascorbique permet d'exprimer l'activité de la peroxydase en volume d'oxygène dégagé par unité de temps à partir de peroxyde d'hydrogène.

Mots clés : *peroxydase, raisin.*

INTRODUCTION

Les phénomènes d'oxydation enzymatique qui se produisent dans les jus de raisin et les vins jouent un rôle important, tant au point de vue théorique que pratique. Les principaux substrats oxydables sont les dérivés polyphénoliques constituant les matières colorantes et les tanins, dont l'oxydation peut être suivie de polymérisation. Selon leur état d'oxydation et de polymérisation, ces dérivés influent sur les caractéristiques organoleptiques du produit, sa couleur, sa limpidité, sa valeur vitaminique P et son évolution au cours du vieillissement.

Dans le cadre d'une étude générale des oxydases présentes dans le raisin, à la suite des travaux de POUX (1966) sur la polyphénoloxydase, on a entrepris une étude sur la peroxydase dans le raisin. En effet, la plupart des travaux réalisés sur ce sujet se rapportent à la polyphénoloxydase et peu concernent la peroxydase.

Les peroxydases sont très répandues dans le règne végétal, les sources les plus riches étant la sève de figuier et la racine de raifort (POLONOVSKI, 1964). Ces enzymes possèdent un groupement prosthétique héminique de structure tétrapyrrolique et catalysent l'oxydation par les peroxydes de nombreuses substances, en particulier des phénols, des amines, des acides aromatiques, jouant le rôle de donneurs d'hydrogène.

La spécificité de la peroxydase pour le substrat est grande : 3 substrats seulement peuvent se combiner à la peroxydase : H_2O_2, MeOOH et EtOOH pour former le complexe enzyme-substrat actif. Dans ce complexe, une molécule de peroxyde est liée à un atome de fer. Cette combinaison enzyme-substrat est très rapide, la réaction inverse ne joue qu'un rôle insignifiant dans l'activité enzymatique. De plus, ce complexe une fois formé ne se décompose pas facilement, il est relativement stable jusqu'à sa rencontre avec le donneur.

La spécificité du complexe enzyme-substrat envers le donneur d'hydrogène est, au contraire, très faible ; de nombreuses substances sont facilement oxydées : des phénols, mono- et polyphénols, aminophénols, des amines, mono- et diamines, des acides aminés, des acides aromatiques, etc.

Le poids moléculaire de la peroxydase de raifort, « *Horse Radish Peroxydase* » (HRP), est de 40 200 selon THEORELL et EHRENBERG (1942), 39 800 selon CECIL et OGSTON (1951). A la température ambiante, elle est stable pendant des semaines, un chauffage de 15 minutes à + 63°C ne l'altère pas et des solutions chauffées au-delà retrouvent après refroidissement une partie de leur activité. A l'état naturel, polyphénoloxydase, peroxydase, catalase et d'autres phénolases, telles que la laccase, sont souvent associées.

A l'heure actuelle, on peut considérer comme démontrée la présence dans le raisin de polyphénoloxydase, de peroxydase et de catalase (HUSSEIN, CRUESS, 1940 ; MARCH, FELDMANN, 1957 ; GASANOV, 1964 ; MARKOVICH, RIKHTER, 1964 ; BOLCATO, PALLAVICINI, LAMPARELLI, 1965 ; POUX, 1967 ; IVANOV, IVANOVA, 1968).

Nous avons essayé d'approfondir nos connaissances sur la présence de cet enzyme dans le raisin afin de nous rendre compte des modifications qu'il peut provoquer.

I. — ÉTUDE D'UNE TECHNIQUE DE MESURE D'ACTIVITÉ A PARTIR DE PEROXYDASE DE *RAPHANUS SATIVUS*

Une technique de dosage de la peroxydase a d'abord été mise au point à partir de peroxydase de *Raphanus sativus* préparée selon la technique de KEILIN, HARTREE (1951) et MAEHLY (1955) qui comporte plusieurs précipitations au sulfate d'ammonium à divers degrés de saturation.

Pour évaluer l'activité peroxydasique, il s'agit de choisir un donneur d'hydro-

gène convenable et d'établir les conditions optimales d'oxydation. Plusieurs donneurs sont utilisés par divers auteurs :

— mésidine : PAUL, AVI-DOR (1954), BOUDET (1965) ;
— pyrogallol : IVANOV, IVANOVA (1968), MAEHLY, CHANCE (1954) ;
— gaïacol : HUSSEIN, CRUESS (1940), LANCE (1955), REYES, LUH, (1960), BOLCATO, PALLAVICINI, LAMPARELLI (1965) ;
— *ortho*-phénylènediamine (OPDA) : WALLERSTEIN *et al.* (1947), VETTER, STEINBERG NELSON (1958), WOOD, LOPEZ (1963), GUINOT, MENORET (1965).

REDDI, ESSELEN et FELLERS (1950) comparent l'emploi de l'OPDA, du pyrogallol et du gaïacol pour déterminer l'activité peroxydasique de la pomme ; ils trouvent des différences qui peuvent s'expliquer soit par l'existence de plusieurs peroxydases agissant chacune sur un seul des substrats, soit par l'existence d'une seule peroxydase agissant différemment avec chaque substrat.

WALLERSTEIN *et al.* (1947) dans une étude sur la peroxydase de la pomme de terre trouvent un excellent accord entre les résultats obtenus avec le pyrogallol et avec l'OPDA ; la fidélité des deux méthodes est la même, mais la sensibilité et la commodité sont nettement plus grandes avec l'OPDA.

Devant ces résultats, il nous a paru intéressant de comparer trois donneurs : gaïacol, OPDA et mésidine.

Le gaïacol donne d'abord un composé rouge-brun, la tétragaïacoquinone. Au cours du temps, la coloration des produits formés varie ; d'abord orangée, puis brune, la solution vire au rouge brique (2 à 3 heures), puis au violet (24 heures) pendant qu'un précipité apparaît et se rassemble au fond des tubes. C'est pour cette raison que certains auteurs, ayant adopté des temps de réaction assez longs, mesurent la densité optique à 540 ou 520 nm, alors que ceux qui utilisent des temps de réaction de quelques minutes mesurent l'absorption dans le violet (LANCE, 1955). Toutes nos mesures ont été effectuées à 470 nm (MAEHLY, CHANCE, 1954).

La coloration obtenue avec l'OPDA est jaune orangée. Le maximum d'absorption a lieu à 420 nm. La coloration se développe pendant plusieurs jours (teinte brune). Au bout de 18 à 24 heures, il se forme dans le milieu des aiguilles orangées très fines ; il peut se former aussi des cristaux plus petits de couleur brune.

La mésidine (2,4,6-triméthylaniline) donne par oxydation un composé pourpre, le 2,6-diméthyl benzoquinone 4-(2′,4′,6′-triméthylbenzène) aniline. Une molécule d'ammoniac est libérée pendant la réaction qui s'écrirait selon PAUL et AVI-DOR (1954) :

$$2 \text{ mésidine} + 3\ H_2O_2 \longrightarrow \text{un composé pourpre} + NH_3 + HCHO + 3\ H_2O$$

La mésidine étant insoluble dans l'eau, il faut tout d'abord la transformer en son chlorhydrate. Au cours de la réaction enzymatique, le mélange se colore en rose violacé, la coloration s'intensifie, puis la solution devient trouble. La courbe d'absorption du produit coloré formé est très aplatie, le maximum d'absorption semble être situé entre 480 et 500 nm. Sa grande solubilité dans l'alcool nous a incités à réaliser la réaction enzymatique en présence de 12 à 20 p. 100 d'éthanol à 95°GL. Mais ces concentrations, qui ne suffisent pas à maintenir le composé pourpre en solution, font apparaître un effet inhibiteur de l'alcool. N'ayant pu établir une méthode chronométrique avec la mésidine, nous avons abandonné l'emploi de ce donneur pour les deux précédents.

TABLEAU I

Conditions expérimentales des donneurs d'hydrogène

Tampon acétique 0,01 M ; pH = 5

Donneur d'hydrogène	λ de la lecture en nm	Concentration en substrat H_2O_2	Concentration en donneur d'H	K*m* mol/l
420	OPDA	$0{,}38 \cdot 10^{-2}$ M	$3 \cdot 10^{-2}$ M	$0{,}13 \cdot 10^{-2}$ M
470	Gaïacol	$0{,}38 \cdot 10^{-2}$ M	$0{,}7 \cdot 10^{-2}$ M	$0{,}7 \cdot 10^{-2}$ M

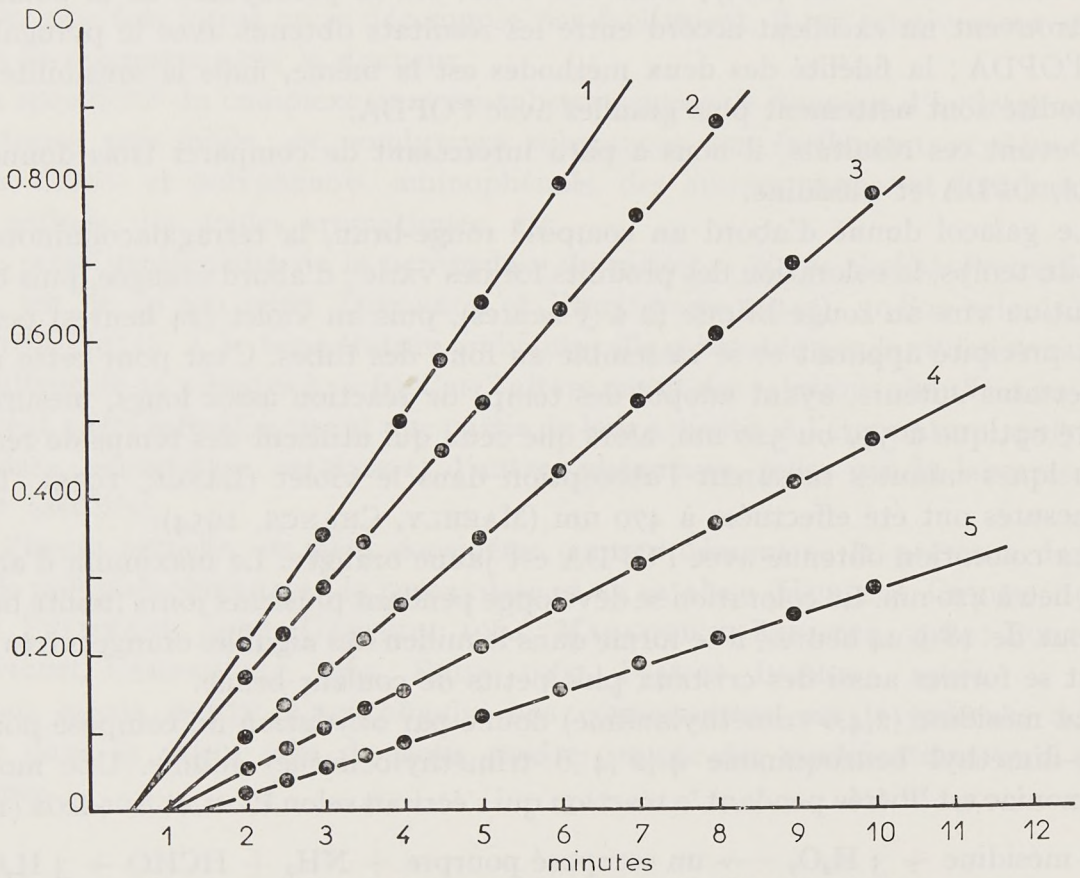


FIG. 1. — *Influence de la concentration en* ortho-*phénylènediamine*

10 ml de tampon pH = 5 ; 1 ml de H_2O_2 0,05 M ; 1 ml d'*ortho*-phénylènediamine à différentes concentrations ; 1 ml de solution enzymatique.

1. OPDA — concentration $3{,}0 \cdot 10^{-2}$ M ; $\frac{dDO}{dt} = 0{,}149$

2. OPDA — concentration $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ M ; $\frac{dDO}{dt} = 0{,}119$

3. OPDA — concentration $0{,}75 \cdot 10^{-2}$ M ; $\frac{dDO}{dt} = 0{,}086$

4. OPDA — concentration $0{,}30 \cdot 10^{-2}$ M ; $\frac{dDO}{dt} = 0{,}052$

5. OPDA — concentration $0{,}15 \cdot 10^{-2}$ M ; $\frac{dDO}{dt} = 0{,}032$

Les conditions optimales obtenues avec ces derniers sont représentées dans le tableau 1. Le mode opératoire retenu pour étudier ces conditions est le suivant :

On pipette dans un tube à essai :

— 10 ml tampon acétique 0,1 M à pH 5 ;
— 1 ml H_2O_2 0,05 M ;
— 1 ml de donneur d'hydrogène de concentration 0,39 M pour l'OPDA (550 mg dans 10 ml eau + 3 ml d'éthanol 95°GL), 0,09 M pour le gaïacol (1,13 g dans 100 ml d'eau).

On agite, puis on ajoute 1 ml de la préparation enzymatique convenablement diluée en même temps que l'on déclenche un chronomètre. On lit la densité optique (à 420 nm pour l'OPDA et à 470 nm pour le gaïacol) toutes les 30 secondes pendant 10 à 15 minutes. On utilise un témoin dans lequel l'eau oxygénée est remplacée par de l'eau distillée.

Pour chaque détermination on construit une courbe avec les densités optiques en ordonnées et les temps en abscisses (fig. 1). Dans les limites de nos mesures on obtient des droites dont on calcule la pente $\left(\frac{dDO}{dt}\right)$. Cette pente représente l'augmen-

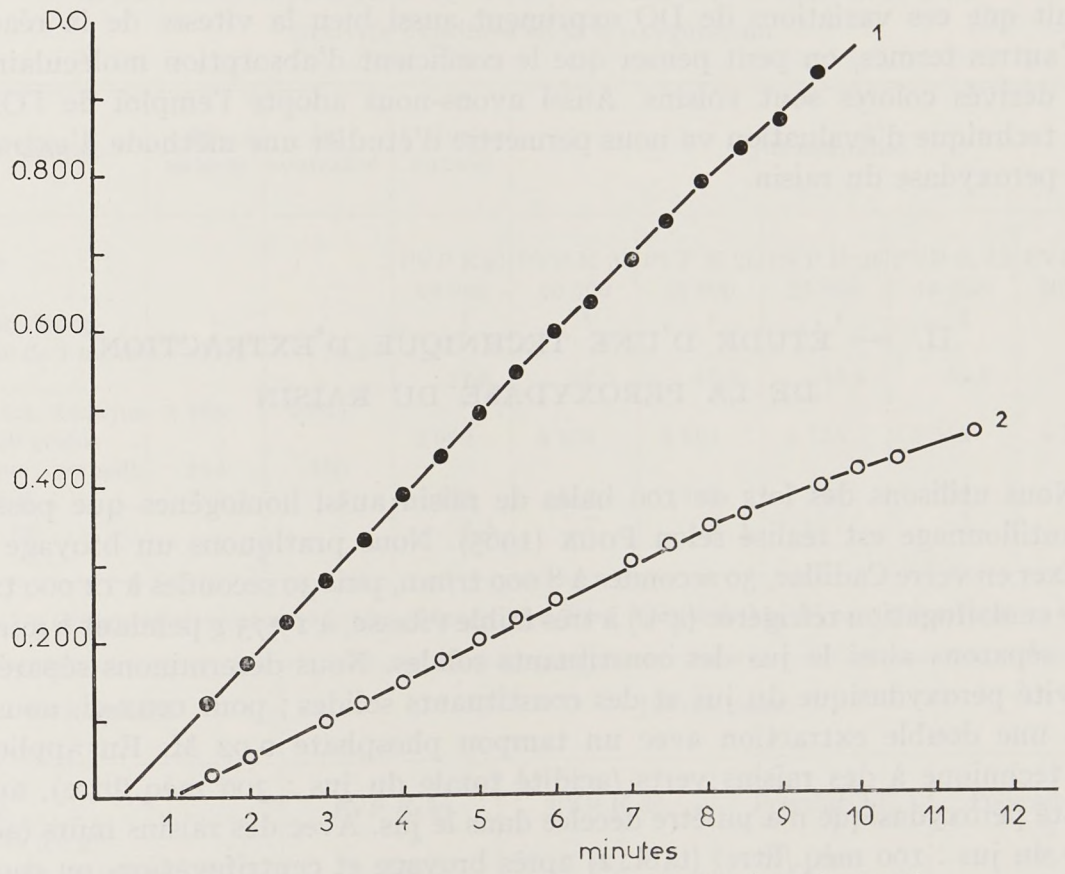


Fig. 2. — *Comparaison entre l'*ortho-*phénylènediamine et le gaïacol*

10 ml de tampon pH = 5, 1 ml de H_2O_2 0,05 M, 1 ml de substrat (concentration dans le milieu égale à K*m*. K*m* de l'*ortho*-phénylènediamine = 0,13 · 10^{-2} M ; K*m* du gaïacol = 0,17 · 10^{-2} M), 1 ml de solution enzymatique.

1. OPDA : $\frac{dDO}{dt} = 0{,}105$

2. gaïacol : $\frac{dDO}{dt} = 0{,}051$

tation de la densité optique par unité de temps, c'est-à-dire la vitesse de la réaction enzymatique. Les résultats peuvent s'exprimer soit par cette vitesse soit, à la suite d'études relatives à l'action de l'acide ascorbique que nous exposerons plus loin, par le volume d'oxygène dégagé à partir de H_2O_2 par unité de temps.

Pour choisir le donneur d'hydrogène le plus sensible, on a déterminé pour chacun la constante apparente de Michaelis (K*m*) par la méthode de Lineweaver et Burk. Cette valeur de K*m* correspond ici à la concentration en donneur pour laquelle le complexe enzyme-substrat (ES) est à demi-saturé, ce qui correspond aussi à une vitesse de réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximale. Cette constante reflète l'affinité de l'enzyme pour le substrat ; plus l'enzyme et le substrat ont tendance à se combiner, plus K*m* est petit. En comparant les K*m* du gaïacol, $0{,}7 \cdot 10^{-2}$, et de l'OPDA, $0{,}13 \cdot 10^{-2}$, on s'aperçoit que la peroxydase de *Raphanus sativus* a une plus grande affinité pour l'OPDA que pour le gaïacol puisque son K*m* est plus faible. Pour une même concentration en enzyme et une concentration en substrat égale à la valeur du K*m*, on a trouvé une augmentation de la densité optique environ deux fois plus faible avec le gaïacol (0,051) qu'avec l'OPDA (0,105) (fig. 2). Comme, d'autre part, les variations de densité optique correspondant à des absorptions égales d'oxygène sont très voisines entre les dérivés colorés de l'OPDA et du gaïacol (écarts mesurés de 8 p. 100 avec la méthode à l'acide ascorbique mentionnée plus loin), il s'ensuit que ces variations de DO expriment aussi bien la vitesse de la réaction. En d'autres termes, on peut penser que le coefficient d'absorption moléculaire des deux dérivés colorés sont voisins. Aussi avons-nous adopté l'emploi de l'OPDA. Cette technique d'évaluation va nous permettre d'étudier une méthode d'extraction de la peroxydase du raisin.

II. — ÉTUDE D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION DE LA PEROXYDASE DU RAISIN

Nous utilisons des lots de 100 baies de raisin aussi homogènes que possible ; l'échantillonnage est réalisé selon Poux (1965). Nous pratiquons un broyage dans un mixer en verre Cadillac, 30 secondes à 8 000 tr/mn, puis 30 secondes à 12 000 tr/mn, et une centrifugation réfrigérée (4°C) à très faible vitesse, à 1 475 *g* pendant 2 minutes. Nous séparons ainsi le jus des constituants solides. Nous déterminons séparément l'activité peroxydasique du jus et des constituants solides ; pour ceux-ci, nous réalisons une double extraction avec un tampon phosphate 0,02 M. En appliquant cette technique à des raisins verts (acidité totale du jus : 300 méq./litre), aucune activité peroxydasique n'a pu être décelée dans le jus. Avec des raisins mûrs (acidité totale du jus : 100 méq./litre) (tabl. 2) après broyage et centrifugation, on constate une certaine activité enzymatique, plus importante si l'on neutralise au broyage et plus importante encore si l'on ajoute en plus la PVP.

On peut penser que le broyage des grains doit amener au contact des enzymes des corps susceptibles de les inactiver, alors que par le fait des structures de la cellule ce contact ne se produit pas dans le fruit entier ; tel serait le cas des matières tannoïdes et des acides qui peuvent provoquer la dénaturation des protéines. En effet,

certains auteurs, JONES et HULME (1961), GOLDSTEIN et SWAIN (1965), puis BOUDET (1965) ont mis en évidence l'action inhibitrice des tanins vis-à-vis des enzymes et ont montré l'action protectrice d'un polymère, la polyvinylpyrrolidone (PVP) par formation d'un complexe PVP-tanins. JONES et HULME (1961) ont obtenu une protection maximale lorsque l'extraction en présence de PVP est réalisée entre pH 7 et 7,5. BOUDET (1965) atteint la protection maximale à pH 5.

Ceci nous a déterminés à étudier le choix de la qualité de la PVP, de la quantité à employer, ainsi que l'action du pH.

2. 1. — *Choix de la qualité de PVP* (tabl. 2)

On a comparé l'emploi des PVP solubles (provenance : Fluka) et des PVP insolubles, type Polyclar AT (provenance G. A. F.).

Parmi les PVP solubles, nous avons disposé d'échantillons de poids moléculaires différents, de 10 000 à 360 000. A dose égale, 1 g pour 100 grains, c'est la PVP K 30 (PM = 40 000) qui a permis d'obtenir l'activité la plus élevée.

TABLEAU 2

Extraction de la peroxydase du raisin. Neutralisation et addition de PVP

Activité exprimée en µl d'oxygène/mn

PVP ajoutée	Jus naturel	Jus neutralisé	Jus naturel	Jus neutralisé				
Variété			PVP K30	PVP K 30	PVP K 25	PVP K 26	PVP K 15	PVP K 90
PM			40 000	40 000	24 000	24 000	10 000	360 000
Quantité (en g)			1	1	1	1	1	1
Activité de 1 ml de jus	17,2	19,5	27,6	42,5	43,1	43,6	35,0	33,9
Activ. tot. dans jus des 50 grains	2 408	2 925	3 089	5 950	5 603	5 755	4 550	4 746
Vol. jus recueilli (en ml)	140	150	138	140	130	132	130	140
pH du jus	3,2	7	3,2	7	7	7	7	7

(Essais effectués sur 50 grains. Cépage *Gros-Vert*. Acidité totale du jus : 100 méq./l)

PVP ajoutée	Jus neutralisé			
Variété	PVP K 30	PVP K 30	Polyclar AT	Polyclar AT
Quantité (en g)	1	2	1	2
Volume du jus recueilli (en ml)	130	152	137	135
Activité de 1 ml de jus	49	48,8	34,4	35,9
Activité tot. dans jus des 100 grains	6 370	7 418	4 713	4 847
Rdt/1 g de PVP K 30		+ 16 p. 100	— 26 p. 100	— 24 p. 100

(Essais effectués sur 100 grains. Cépage *Carignan* rouge. Acidité totale du jus : 102 méq./l)

TABLEAU 3

Extraction de la peroxydase du raisin en fonction de la quantité de PVP K 30 ajoutée

Activité exprimée en µl d'oxygène/mn

	Jus neutralisé				
Quantité PVP K 30 (en g)	0,5	1	1,5	2	3
Vol. du jus recueilli (en ml)	150	150	156	158	162
Activité de 1 ml de jus...	33,1	55,1	67,7	66,6	57,4
Activ. tot. dans jus des 100 grains	4 959	8 265	10 561	10 523	9 299
Rdt/1 g de PVP K 30 ...	— 40 p. 100	0 p. 100	+ 28 p. 100	+ 27 p. 100	+ 13 p. 100

(Essais effectués sur 100 grains. *Carignan* rouge. Acidité totale du jus : 106 méc./l).

TABLEAU 4

Influence du pH d'extraction

Essais effectués sur 100 grains
Activité exprimée en µl d'oxygène/mn
Volume du jus en ml

Essais	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
N° 1 : Blanc					
Volume jus	66	78	100		
Activité du jus total ..	3 044	3 474	4 910		
N° 2 : Blanc					
Volume jus	100			125	
Activité du jus total ..	3 474			4 520	
N° 3 : Blanc					
Volume jus	95	107		125	
Activité du jus total ..	2 268	2 814		4 796	
N° 4 : Blanc					
Volume jus	100			125	
Activité du jus total ..	2 613			4 594	
N° 5 : Rouge					
Volume jus	61			88	
Activité du jus total ..	2 986			5 111	
N° 6 : Rouge					
Volume jus	105			140	
Activité du jus total ..	3 769			6 030	
N° 7 : Rouge					
Volume jus	108		126	162	144
Activité du jus total ..	4 709		6 863	7 237	7 093

Le Polyclar AT insoluble apparaît moins efficace que la PVP soluble K 30 caractérisée par un poids moléculaire du même ordre de grandeur que celui de la peroxydase, tout se passant comme si la protection de la protéine était mieux assurée par un complément de même poids moléculaire.

2. 2. — *Choix de la quantité de PVP à ajouter* (tabl. 3)

L'action de 0,5-1-1,5-2 et 3 g de PVP K 30 a été comparée. Jusqu'à 2 g l'activité augmente avec la dose de PVP ajoutée. Au-delà, nous avons noté une baisse sensible de l'activité enzymatique. Mais, comme entre 1 et 2 g la différence est assez faible, nous avons adopté et utilisé par la suite 1 g de PVP pour 100 baies de raisin.

2. 3. — *Influence du pH* (tabl. 4)

Les raisins ont été amenés pendant le broyage à des pH compris entre 6 et 10. Plus le pH est élevé, plus le rendement en jus est important, ainsi que le taux d'extraction de la peroxydase. Nous avons cependant retenu le pH 6,5 qui est le plus commode et le plus sûr à réaliser dans tous les cas, le volume de KOH à ajouter étant calculé d'après l'acidité du jus telle qu'on la détermine couramment.

2. 4. — *Influence de la vitesse de centrifugation* (tabl. 5)

TABLEAU 5

Influence de la vitesse de centrifugation sur la teneur des jus de raisin en peroxydase
Cépage utilisé : *Carignan* rouge — Activité exprimée en µl d'oxygène/mn/ml de jus

Essais	Vitesse de centrifugation en *g*									
	1 475	1 935	3 020	3 640	4 340	5 090	5 900	7 710	17 300	27 000
N° 1										
Activité	19,5	17,8	17,8							
Perte p. 100		8,8	8,8							
N° 2										
Activité	33,3			27,3		27,3				
Perte p. 100				18		18				
N° 3										
Activité	37,6					29,6	30,5			
Perte p. 100						21,4	19			
N° 4										
Activité	39,6				36,2			36,2	36,2	
Perte p. 100					8,7			8,7	8,7	
N° 5										
Activité	54,5	54,5	51,7		51,7					47,4
Perte p. 100		0	5,2		5,2					13

Le jus obtenu par centrifugation du fruit broyé à la vitesse la plus faible (1 475 *g*) est par la suite recentrifugé à des vitesses de plus en plus élevées jusqu'à 27 000 *g*. On constate que la vitesse de centrifugation influe peu sur l'activité peroxydasique du jus, alors qu'il a été trouvé qu'elle influait fortement sur l'activité polyphénoloxydasique (Poux, 1966). On peut voir aussi que son influence a varié différemment avec les essais considérés. Ainsi, si dans un essai on peut constater une perte de 20 p. 100 à 5 900 *g*, dans un autre elle n'est que de 8 p. 100 à 17 300 *g* et dans un autre encore de 13 p. 100 à 27 000 *g*. La peroxydase du raisin serait donc, en grande partie, soit sous forme soluble, soit liée à des particules légères, difficiles à centrifuger.

2. 5. — *Influence du broyage des grains* (tabl. 6).

Trois degrés de broyage ont été comparés :

— Mixer (Cadillac) : 1 fois 30 secondes à 8 000 tr/mn et 1 fois 30 secondes à 12 000 tr/mn,
— Mixer (Cadillac) : 3 fois 30 secondes à 8 000 tr/mn et 3 fois 30 secondes à 12 000 tr/mn,
— Broyeur B. 17. CNTA : 3 fois 20 secondes.

TABLEAU 6

Influence du broyage du raisin sur la teneur du jus en peroxydase

Essai (1) : Broyage 30 sec. à 8 000 tr/mn + 30 sec. à 12 000 tr/mn
Essai (2) : — 3 fois 30 sec à 8000 tr/mn + 3 fois 30 sec à 12000 tr/mn
Essai (3) : Broyeur B.17, 3 fois 20 sec
Activité exprimée en µl d'O_2/minute

	Rendement en jus en ml	Activité de 1 ml de jus	Activité du jus des 50 grains	Activité du culot des 50 grains	Activité totale des 50 grains
Essai (1)	104	41,6	4 336	2 412	6 748
Essai (2)	90	49,4	4 451	4 078	8 529
Essai (3)	112	50,5	5 657	3 101	8 758

Lorsque l'intensité du broyage augmente, non seulement l'activité peroxydasique du jus se trouve augmentée mais aussi celle des constituants solides. Un fort broyage permet de libérer davantage de peroxydase par déchirement plus poussé des tissus.

2. 6. — *Influence de l'échantillonnage des baies* (tabl. 7)

Plusieurs lots de raisin provenant d'un même prélèvement et échantillonnés selon Poux (1965) ont été testés pour déterminer leur activité peroxydasique. Une différence de 10 à 14 p. 100 peut se manifester entre l'activité totale du jus de divers lots ; cela nous permettra d'estimer les différences significatives trouvées au cours de nos essais.

TABLEAU 7

Influence de l'échantillonnage sur l'activité peroxydasique
Lot de 100 grains. Activité exprimée en µl d'oxygène/mn

Cépage		1er lot	2e lot	3e lot	4e lot	Moyenne	Écart % max.
Carignan rouge	Vol. jus de 100 grains en ml	105	128	105	124,		
	Activ. du jus de 100 grains	5 887	6 605	5 657	6 404	6 138	14
	Activ. du culot de 100 grains	5 054		4 594	3 561		
	Activ. tot. de 100 grains ..	10 941		10 252	9 965		9
	Activ. de 1 ml de jus	55,7	51,7	54	51,7		7
Grenache rouge	Vol. jus de 100 grains en ml	52	55	57	60		
	Activ. du jus de 100 grains	2 699	2 814	2 785	3 015	2 828	10
	Activ. de 1 ml de jus	51,7	51,1	48,8	50,5		5,6
Grenache blanc	Vol. jus de 100 grains en ml	56	64	63	60		
	Activ. du jus de 100 grains	2 010	2 125	2 354	2 240	2 182	14
	Activ. de 1 ml de jus	35,9	33,3	37,3	37,6		11

2. 7. — *Purification de la peroxydase* (tabl. 8)

On a essayé d'obtenir la peroxydase du raisin, dans un état aussi purifié que possible, par précipitation au sulfate d'ammonium, étant donné que la peroxydase est soluble dans le sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration de 58 p. 100 et insoluble au-dessus de 62 p. 100 (MAEHLY, 1955). Les essais de purification ont été réalisés d'une part sur le jus seul, d'autre part sur le jus additionné du liquide d'extraction des constituants solides. Nous avons constaté qu'une seule précipitation à saturation, le précipité étant ensuite solubilisé dans du tampon phosphate pH 7, 0,02 M, provoque une perte d'activité de 15 p. 100 environ.

Nous avons aussi appliqué la technique utilisée par KEILIN et HARTREE (1951) pour la préparation de la peroxydase purifiée du raifort. Cette technique permet d'obtenir, d'une part, la peroxydase 1 qui représente les protéines précipitant entre 50 et 100 p. 100 de saturation en sulfate et, d'autre part, la peroxydase 2 constituée par la fraction de protéines précipitant à 30 p. 100 de saturation. Les deux extraits, 1 et 2, présentent une activité peroxydasique du même ordre de grandeur correspondant à environ 5 à 9 p. 100 seulement de l'activité du départ, jus seul ou jus + culot réunis. La purification a donc provoqué une très grande perte de l'activité peroxydasique, 90 à 95 p. 100.

2. 8. — *Identification de la peroxydase* (tabl. 8)

Il fallait savoir si l'activité peroxydasique manifestée par le jus de raisin et les extraits des constituants solides de plus en plus purifiés correspondait à un seul et même enzyme. Pour cela, nous avons pris comme critère de comparaison la valeur de la constante de Michaelis. L'affinité représentée par la valeur de Km

TABLEAU 8

Purification de la peroxydase par précipitation au sulfate d'ammonium
Détermination de la constante de Michaelis Km

Activité exprimée en µl d'oxygène/mn

	Activ. tot. du jus de 100 grains	Activ. tot. de 100 grains	Perte p. 100	Km
Terret blanc				
(Jus + culot) réunis :				
Naturel		8 750		
Après précipitation au $SO_4(NH_4)_2$ à saturation ..		7 462	15	
Terret gris				
(Jus + culot) réunis :				
Naturel		10 474		
Après précipitation au $SO_4(NH_4)_2$ à saturation ..		8 612	18	
Carignan rouge (22/9)				
Jus	5 399			$1{,}83 \cdot 10^{-2}$
Peroxydase 1 du jus.....	253		95	
Peroxydase 2 du jus.....	522		90	$1{,}84 \cdot 10^{-2}$
Carignan rouge (8/10)				
(Jus + culot) réunis		8 491		
Peroxydase 1		696	91	
Peroxydase 2		646	92	
Listan				
(Jus + culot) réunis		9 649		$1{,}5 \cdot 10^{-2}$
Peroxydase 1		736	92	$1{,}8 \cdot 10^{-2}$
Peroxydase 2		598	94	$1{,}9 \cdot 10^{-2}$

est indépendante de la concentration en enzyme. Pour certains enzymes, l'affinité est indépendante de la purification, pour d'autres la purification élimine des impuretés qui modifient l'affinité. Pour tous les cas envisagés, jus pur, jus + culot, peroxydase 1 et 2, nous avons obtenu des Km du même ordre de grandeur : 1,7 à $1{,}9 \cdot 10^{-2}$ M. Il semble que le raisin ne renferme qu'une seule qualité de peroxydase dont l'affinité pour l'OPDA n'est pas modifiée par la purification. Ces Km ont été comparés à ceux obtenus avec une peroxydase provenant de *Raphanus sativus* et à une autre peroxydase cristallisée du commerce (Boehringer) provenant du raifort. Ces Km ont été respectivement pour la peroxydase de *Raphanus sativus* $0{,}13 \cdot 10^{-2}$ M et pour la peroxydase cristallisée du raifort (Boehringer) $0{,}3 \cdot 10^{-2}$ M.

On peut donc dire que la peroxydase du raisin a une affinité pour l'OPDA plus faible que celle de *Raphanus sativus* et du raifort.

Étant donné ces résultats, nous avons pensé que dans un premier temps il était inutile de purifier la peroxydase du raisin en vue de son étude et nous avons conservé la technique d'extraction décrite au début de ce chapitre.

III. — ÉTUDE DE LA MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA PEROXYDASE DU RAISIN

La peroxydase du raisin paraissant différente de celle de *Raphanus sativus*, nous nous sommes proposés de déterminer les conditions optimales particulières de son dosage, et ainsi nous avons étudié l'influence de certains facteurs.

3. 1. — *Influence du donneur d'hydrogène* (tabl. 9)

On sait que les différentes peroxydases réagissent préférentiellement avec certains donneurs ; aussi nous avons comparé l'emploi du gaïacol et de l'OPDA. Pour obtenir avec le gaïacol une activité mesurable, il faut l'utiliser à une concentration élevée (0,18 M) et ne pas diluer le jus ou le diluer très peu ; le dosage est alors impraticable avec des jus colorés. On ne peut pas faire des solutions de gaïacol de concentration supérieure à 0,18 M étant donné la faible solubilité de ce corps dans l'eau. Pour la même quantité de jus, le dégagement d'oxygène avec la concentration maximale d'OPDA pouvant être utilisée est environ cinq fois plus élevée qu'avec le gaïacol à concentration maximale et de sept à vingt fois plus élevée qu'avec le gaïacol à la concentration normalement utilisée, c'est-à-dire 0,09 M. Il reste donc préférable d'utiliser l'OPDA.

TABLEAU 9

Comparaison entre l'emploi du gaïacol et l'o-phénylènediamine
Activité exprimée en µl d'oxygène/mn/ml de jus

	o-phénylènediamine 0,39 M	gaïacol 0,09 M	gaïacol 0,18 M
Concentration dans le milieu réactionnel .	$3 \cdot 10^{-2}$ M	$0{,}7 \cdot 10^{-2}$ M	$1{,}38 \cdot 10^{-2}$ M
Activité jus n° 1	67,5	9,0	13,50
Activité jus n° 2	56,6	8,6	
Activité jus n° 3	43	2,3	

3. 2. — *Influence du pH* (tabl. 10)

On a déterminé l'influence sur la réaction enzymatique de la valeur du pH d'une part, et de la constitution du tampon réglant le pH d'autre part. Alors qu'avec un tampon acétate l'activité mesurée augmente avec le pH entre 4 et 6, c'est le contraire qui se produit avec des tampons borate. En milieu tampon bitartrate pH 3, qui représente le milieu « jus de raisin », l'activité peroxydasique se manifeste très faiblement et à pH 7 (tampon phosphate 0,05 M) la peroxydase ne développe pour ainsi dire aucune activité.

A l'aide du tampon citrate-phosphate, en faisant varier le pH de 2,6 à 7, on a pu déterminer une courbe (fig. 3) qui présente un maximum d'activité à pH = 5,4.

Dans tous nos essais nous avons conservé l'emploi du tampon acétate pH 5 qui donne des résultats très reproductibles.

TABLEAU 10

Influence du pH et de la composition du tampon

Activité de 1 ml de jus exprimée en µl d'oxygène/mn

Composition du tampon	pH du dosage						
	2,6	3,0	4,0	5,0	5,4	6,0	7,0
Tampon acétate 0,1 M			23,2	42,5	45,9	44,0	
Tampon borate 0,02 M			42,5	41,1		33,6	10,9
Tampon bitartrate 0,033 M.....		13,2	13,2				
Tampon phosphate 0,05 M							3,4
Tampon citrate-phosphate	5,00	8,4	16,6	20,3	21,4	9,9	1,9

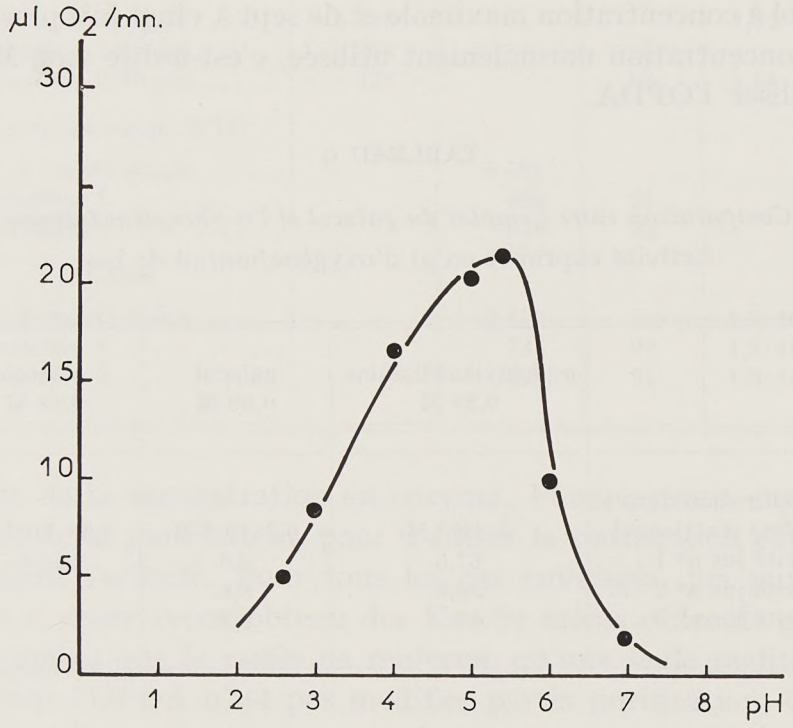


FIG. 3. — *Influence du pH sur la réaction enzymatique*

10 ml de tampon citrate-phosphate à différents pH, 1 ml de H_2O_2 0,05 M, 1 ml d'*ortho*-phénylènediamine 0,39 M, 1 ml de solution enzymatique.

3. 3. — *Influence de la concentration en substrat H_2O_2* (tabl. 11)

On sait que lorsque la concentration en H_2O_2 augmente, l'activité peroxydasique augmente aussi jusqu'à une certaine concentration, puis diminue. Certaines peroxydases sont plus facilement détruites par de hautes concentrations en H_2O_2 que d'autres (THEORELL, 1951). Nous avons voulu fixer la concentration limite

pour la peroxydase du raisin. Cette limite a été trouvée très élevée : c'est à partir d'une concentration dans le milieu réactionnel égale à $6{,}37 \cdot 10^{-2}$ M que l'activité peroxydasique décroît. Pour obtenir cette concentration, il faut utiliser une solution M de H_2O_2. Un palier existe pour une concentration comprise entre 0,57 et $1{,}91 \cdot 10^{-2}$ M.

TABLEAU II

Influence de la concentration en H_2O_2 sur l'activité peroxydasique du jus de raisin

Concentration (moles) H_2O_2 dans le milieu réactionnel	Activité 1 ml de jus en µl d'oxygène/mn
$0{,}19 \cdot 10^{-2}$	33,9
$0{,}38 \cdot 10^{-2}$	40,2
$0{,}57 \cdot 10^{-2}$	43
$0{,}76 \cdot 10^{-2}$	46
$1{,}15 \cdot 10^{-2}$	46
$1{,}51 \cdot 10^{-2}$	46,5
$1{,}91 \cdot 10^{-2}$	47,1
$2{,}55 \cdot 10^{-2}$	91,3
$3{,}82 \cdot 10^{-2}$	98,2
$5{,}0 \cdot 10^{-2}$	101,7
$6{,}37 \cdot 10^{-2}$	107,4
$7{,}65 \cdot 10^{-2}$	94,8
$15{,}30 \cdot 10^{-2}$	82,1
$38{,}25 \cdot 10^{-2}$	55,7

3. 4. — *Influence de la dilution* (tabl. 12)

Étant donné les conditions opératoires utilisées, nous devons diluer le jus pour obtenir des vitesses d'activité enzymatique mesurables avec précision ; il fallait alors vérifier si l'activité enzymatique était proportionnelle à la dilution. On peut dire que cela est réalisé : on note un écart de 3 p. 100 pour des dilutions de jus comprises entre 1/5 et 1/40. Étant donné que les dilutions ont été généralement faites au 1/10 ou au 1/20, les résultats pourront donc être ramenés très facilement au jus pur.

TABLEAU 12

Influence de la dilution du jus de raisin sur l'activité peroxydasique

Activité exprimée en µl d'oxygène/mn/ml

Dilution	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{40}$
Activité du jus dilué	5,4	2,6	1,3	0,9	0,69
Activité ramenée au jus pur	27	26	26	27	27,6

3. 5. — *Influence des antioxydants*

a) *L'acide ascorbique* (fig. 4)

L'acide ascorbique ajouté avant l'enzyme dans le milieu réactionnel retarde l'apparition de la couleur qui traduit l'activité enzymatique ; le retard varie avec la concentration en acide ascorbique. Pour des additions en acide ascorbique de 0,25 et 0,50 μM, on obtient des courbes d'activité décalées de la courbe témoin mais

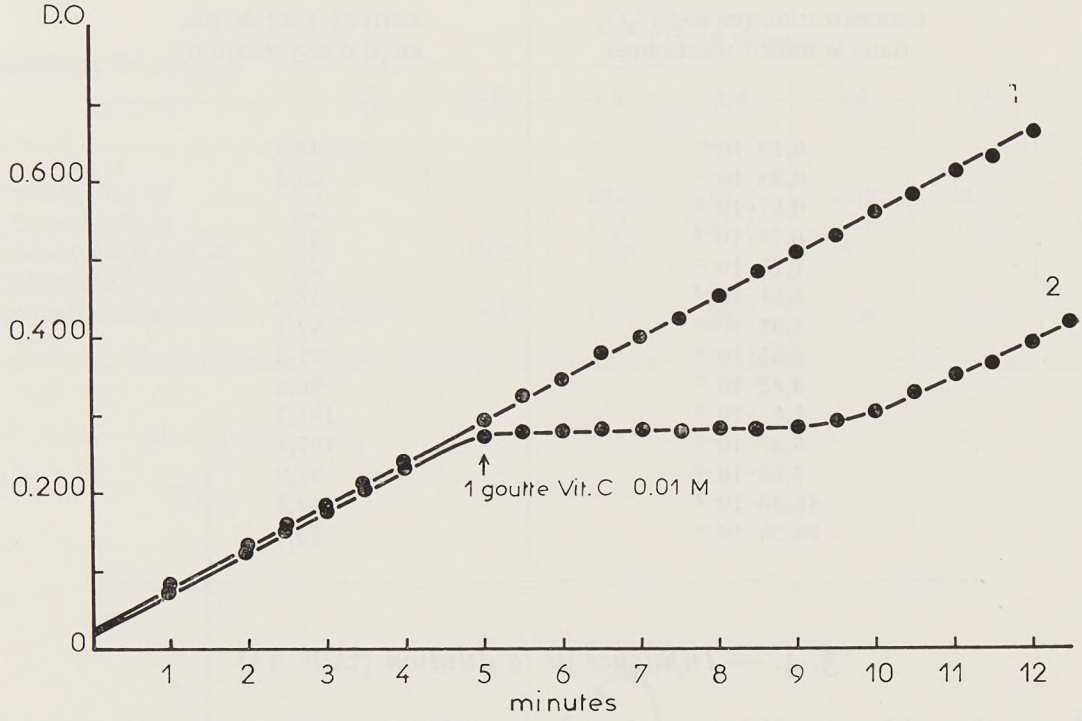


FIG. 4. — *Action de l'acide ascorbique*

10 ml de tampon pH = 5, 1 ml de H_2O_2 0,05 M, 1 ml d'*ortho*-phénylènediamine 0,39, 1 ml de solution enzymatique.
1. Témoin.
2. 1 goutte d'acide ascorbique 0,01 M ajoutée dans la cuve de 3 ml à la 5e minute.

absolument parallèles. L'activité peroxydasique n'est donc pas altérée pour ces concentrations. Ajouté quelques minutes après le départ de la réaction enzymatique, l'acide ascorbique arrête l'accroissement de la densité optique. Quant tout l'acide ascorbique a été oxydé, la densité optique recommence à augmenter.

Il n'y a jamais décoloration du mélange réactionnel après addition d'acide ascorbique ; la réaction donnant les produits colorés n'est donc pas réversible. Voici comment on peut expliquer ces phénomènes :

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (1)$$
$$(H_2O_2)$$

$$ES + AH_2 \xrightarrow{k_4} E + SH_2 + A \qquad (2)$$
$$\text{(donneur)}$$

Dans l'équation (2) le donneur peut être l'OPDA ou l'acide ascorbique. Si l'on considère les valeurs de k_4 (tabl. 13) d'après MAEHLY (1955) nous voyons que la valeur la plus faible de k_4 est celle de la réaction avec l'acide ascorbique. Aussi, en présence d'un mélange d'OPDA et d'acide ascorbique, la réaction enzymatique aura lieu préférentiellement aux dépens de l'amine-phénol avec formation de quinone, l'acide ascorbique réagit alors avec la quinone apparue, la réduit et s'oxyde en acide déhydroascorbique.

TABLEAU 13

Valeurs des constantes k_1
(en mole par mole d'enzyme et par seconde)

Donneur	M^{-1} s^{-1}	pH
Ortho-phénylènediamine	$5 \cdot 10^7$	7
Acide ascorbique	$2 \cdot 10^4$	4,7

Bien que la réaction enzymatique se poursuive, il n'y aura pas apparition de couleur dans le milieu tant qu'il restera de l'acide ascorbique pour réduire la quinone en redonnant l'amine.

Cette réaction nous a permis d'exprimer l'activité enzymatique de la peroxydase en volume d'oxygène dégagé à partir de H_2O_2 par unité de temps.

Deux essais sont réalisés, l'un avec, l'autre sans acide ascorbique et on détermine la densité optique correspondant à l'arrêt apparent de l'activité enzymatique provoqué par l'addition d'acide ascorbique. Cette densité optique correspond à une quantité d'oxygène égale à celle absorbée par la quantité d'acide ascorbique ajoutée, soit AB (fig. 5). Cette densité optique, pour la même addition d'acide ascorbique, varie quelque peu avec les différents essais ; cela provient certainement d'une légère oxydation enzymatique de l'acide ascorbique ; aussi avons-nous pris pour nos calculs le chiffre obtenu avec la peroxydase pure Boehringer, soit 0,195 pour 88 µg d'acide ascorbique, c'est-à-dire 5,6 µl d'oxygène dégagé.

Pour chaque test peroxydasique, nous déterminons l'augmentation de densité optique par minute ; cette valeur est multipliée par le coefficient $\frac{5,6}{0,195} = 28,7$ pour obtenir les µl d'oxygène dégagés à la minute.

b) *Le* SO_2

Si l'on introduit du SO_2 au cours de la réaction enzymatique, deux cas peuvent se produire suivant la concentration en SO_2 par rapport à celle de H_2O_2.

Lorsque la concentration en SO_2 est supérieure à celle en H_2O_2, la réaction est stoppée à peu près immédiatement ; la densité optique ne varie plus. Mais quelle que soit la concentration en SO_2 atteinte, il n'y a jamais destruction des produits responsables de l'absorption à 420 nm ; la réaction colorée avec l'OPDA n'est donc pas réversible. Dès qu'on rajoute H_2O_2 en concentration supérieure à celle du SO_2,

l'activité peroxydasique se rétablit aussitôt avec la vitesse initiale. Si la concentration en H_2O_2 reste inférieure à celle du SO_2, la réaction reste bloquée.

Lorsque la concentration en SO_2 est inférieure à celle en H_2O_2, la réaction enzy-

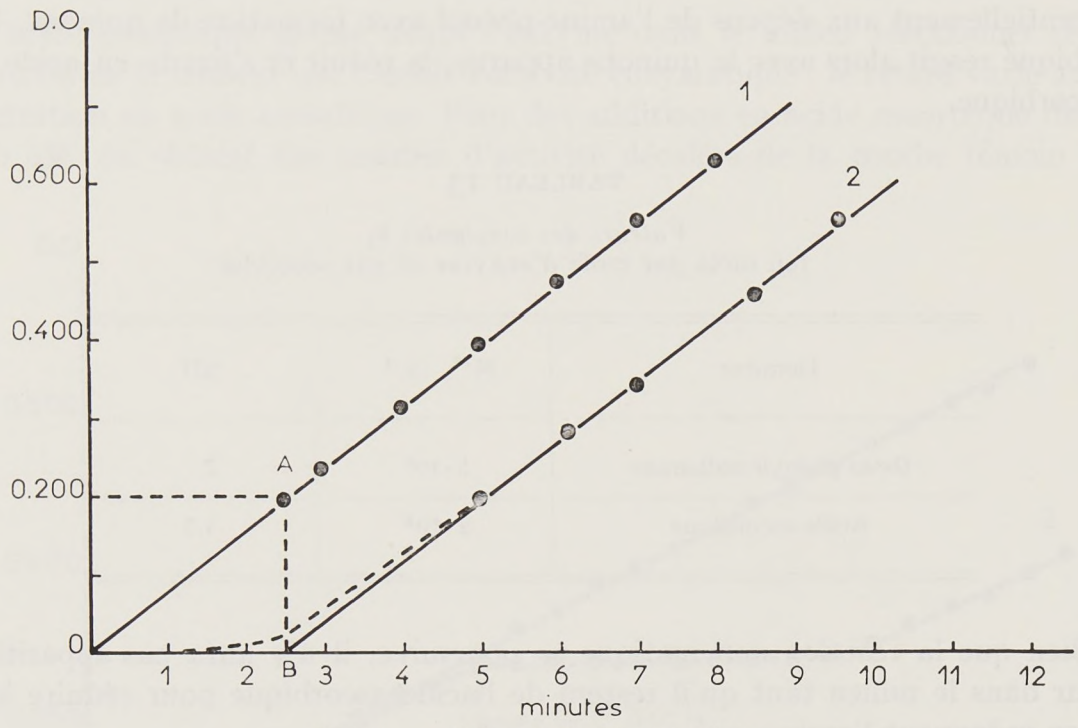


FIG. 5. — *Action de l'acide ascorbique*

9,4 ml de tampon pH = 5, 1 ml de H_2O_2 0,05 M, 1 ml d'*ortho*-phénylènediamine 0,39 M, 1 ml de solution enzymatique, 0,6 ml d'acide ascorbique.

1. Jus témoin: $\frac{dDO}{dt} = 0{,}078$

2. Jus témoin + acide ascorbique (88 µg): $\frac{dDO}{dt} = 0{,}078$

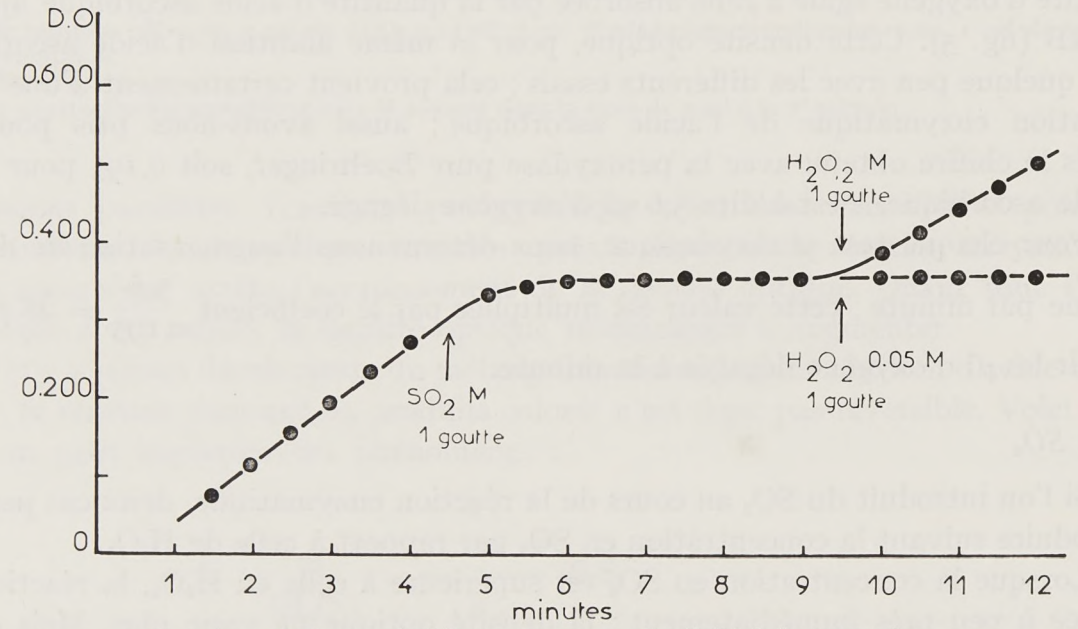


FIG. 6. — *Influence de* SO_2 *sur la mesure d'activité de la peroxydase*

10 ml de tampon pH = 5, 1 ml de H_2O_2 0,05 M, 1 ml d'*ortho*-phénylènediamine 0,39 M, 1 ml de solution enzymatique. Expérimentation dans des cuves de 3 ml. On ajoute à la 4e minute 1 goutte de solution M de SO_2, puis à la 9e minute 1 goutte de H_2O_2 0,05 M dans une cuve et 1 goutte de H_2O_2 M dans l'autre cuve.

matique ne varie pas d'intensité ou ralentit comme on le constate en fonction de la diminution de concentration en H_2O_2.

Il semble donc que SO_2 n'agit sur la réaction enzymatique que par la destruction de H_2O_2 qu'il provoque (fig. 6).

Ces résultats confirment ceux de MONIKOWSKI et CHMIELNICKA (1964) qui ont étudié « le rôle de l'acide sulfureux dans le processus d'oxydation peroxydasique de l'acide L-ascorbique en présence d'eau oxygénée ». De leurs expériences ils ont déduit que le SO_2 est un inhibiteur de la peroxydase du raifort par la destruction du peroxyde d'hydrogène qui ne peut plus former le complexe EAD (enzyme-accepteur-donneur). Ils ont aussi déterminé que la vitesse de la réaction :

$$SO_2 + H_2O_2 \longrightarrow SO_3 + H_2O$$

est plus grande que la vitesse de formation du complexe EAD, de telle sorte que SO_2, en réduisant H_2O_2, provoque le blocage de l'activité enzymatique et maintient la stabilité du donneur présent à l'état réduit.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'établir une technique d'extraction et une méthode rapide et précise de dosage de la peroxydase du raisin. Deux faits essentiels ressortent de cette étude.

1° Étant donné qu'une partie de la peroxydase du raisin peut être détruite par les tanins et les acides du fruit lorsqu'ils sont mis en présence au cours de l'écrasement du grain, les résultats obtenus peuvent être très différents selon la technique d'extraction utilisée.

2° Étant donné les différences d'affinité de cet enzyme pour les donneurs d'hydrogène pouvant réagir, le choix du donneur sera lui aussi à l'origine de grandes variations dans la détermination de l'activité peroxydasique.

Nous avons pu mettre en évidence dans le raisin la présence d'une seule qualité de peroxydase possédant une affinité pour l'OPDA très nettement inférieure à celle de la peroxydase du raifort.

L'activité peroxydasique du raisin n'est pas négligeable ; elle correspond environ à un dégagement d'oxygène à partir de H_2O_2 de 50 ml par litre de jus et par minute.

Ces résultats permettent déjà de prévoir que l'activité peroxydasique du jus de raisin sera bien différente selon que le jus aura été en contact plus ou moins prolongé avec les éléments solides du fruit, rafle en particulier, qui renferment une grande quantité de matières tannoïdes susceptibles de se fixer sur la protéine de l'enzyme, ou aura été obtenu par écrasement rapide de la baie suivi d'égouttage et sera pauvre en ces dérivés ; des différences pourront aussi apparaître selon l'état de maturité du raisin, c'est-à-dire selon son acidité et sa teneur en dérivés polyphénoliques.

Reçu pour publication en mai 1972.

SUMMARY

DETERMINATION OF PEROXYDASE IN GRAPES

A technique for extracting and measuring the activity of peroxydase in the grapes is proposed.

Extraction is carried out on a batch of 100 grapes as homogenous as possible. They are crushed in a glass liquidize for 30 seconds at 8 000 r/mn, then 30 seconds at 12 000 r/mn and centrifugalized at 4°C at 1 475 *g* for 2 minutes.

Extraction of the enzyme is better if a neutral or even alkaline medium is used and if it is protected, by 1 gram polyvinylpyrrolidone, from the inhibitory action of tannoid substances.

To measure peroxydase activity, 1 ml hydrogen peroxide 0,05 M and 1 ml 0,30 M solution of orthophenylenediamine (550 mg in 10 ml water + 3 ml ethanol at 95°GL) is added to 10 ml acetic buffer 0,1 M at pH 5. After agitation 1 ml enzymatic preparation, suitably diluted, is added. Optical density at 420 mm is read every 30 seconds for 10-15 minutes. In the control test hydrogen peroxide is replaced by distilled water.

The use of ascorbic acid permits peroxydase activity to be expressed as the volume of oxygen released per time unity from the hydrogen peroxide.

RESUMEN

DETERMINACION DE LA PEROXIDASA EN LA UVA

Se propone una técnica de extracción y de medida de actividad de la peroxidasa de la uva.

La extracción es realizada sobre un lote de 100 bayas de uva, lo más homogéneas posible. Se tritura en un mixer de vidrio durante 30 segundos a 8 000 r.p.m., y, acto seguido, durante 30 segundos a 12 000 r.p.m. y se procede a una centrifugación a 4°C a 1 475 *g* durante 2 minutos.

La extracción de la enzima es mejor si se opera en medio neutro e incluso alcalino y si se la protege, por medio de un gramo de polivinilpirolidona, de la acción inhibidora de las materias tanoides.

Para medir la actividad de la peroxidasa, a 10 ml de tampón acético 0,1 M con pH 5, se añade 1 ml de péroxido de hidrógeno 0,05 M y 1 ml de solución 0,39 M de ortofenilenediamina (550 mg en 10 ml de agua + 3 ml de etanol a 95°GL). Previa agitación, se añade 1 ml de preparación enzimática convenientemente diluida. Se lee la densidad óptica a 420 mm cada 30 segundos durante 10-15 minutos. En el ensayo en blanco, se sustituye el peróxido de hidrógeno por agua destilada.

El empleo del ácido ascórbico permite expresar la actividad de la peroxidasa en volumen de oxígeno desprendido por unidad de tiempo a partir de peróxido de hidrógeno.

RIASSUNTO

DETERMINAZIONE DELLA PEROSSIDASI NELL'UVA

Viene proposta una tecnica d'estrazione e di misura dell' attività della perossidasi dell'uva.

L'estrazione è effectuata su un lotto di 100 bacche d'uva quanto più omogenea possibile. Si effettua una frantumazione in un frullatore in vetro durante 30 secondi a 8 000 giri/mn, poi durante 30 sec. a 12 000 giri/mn e si centrifuga a 4°C a 1 475 *g* durante 2 min.

L'estrazione dell'enzima è migliore se si agisce in ambiente neutro o anche alcalino e se si protegge dall' azione inibitoria delle materie tanniche mediante un grammo di polivinilpirolidone.

Per misurare l'attività della perossidasi, a 10 ml di tampone acetico 0,1 M a pH 5, si aggiunge 1 ml di perossido d'idrogeno 0,05 M e 1 ml di soluzione 0,39 M d'ortofenilenediamine (550 mg in

10 ml d'acqua + 3 ml d'etanolo a 95°GL). Dopo agitazione, si aggiunge 1 ml di preparazione enzimatica opportunamente diluita. Si legge la densità ottica a 420 mm ogni 30 secondi durante 10-15 minuti. Nella prova a bianco, si sostituisce il perossido d'idrogeno con dell'acqua distillata.

L'impiego dell' acido ascorbico permette di esprimere l'attività della perossidasi in volume d'ossigeno sprigionato per unità di tempo a partire dal perossido d'idrogeno.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bolcato V., Pallavicini C., Lamparelli F., 1965. Séparation sur Sephadex des enzymes des moûts de raisins et des vins. *Riv. Vitic. Enol.*, **18**, 42-48.

Boudet A., 1965. *Sur quelques aspects de l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de* Quercia sessilis ehch. Thèse d'Université. Faculté de Toulouse.

Cecil R., Ogston A. G., 1951. *Biochem. J.*, **49**, 105.

Gasanov T. G., 1964. Enzymes oxydatifs et protéolytiques dans les variétés de vignes utilisées pour la production de vins de table (en russe). *Uch. Zap. Azerb. Gos. Univ. Ser. Biol. Nauk*, **2**, 79-91.

Guinot Y., Menoret Y., 1965. Le chauffage continu du raisin avant pressurage. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **51**, 866-872.

Goldstein J. L., Swain T., 1965. The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry*, **4**, 185-192.

Hussein A. A., Cruess W. V., 1940. Properties of the oxydizing enzymes of certain *vinifera* grapes. *Food Res.*, **5**, 637-648.

Ivanov T., Ivanova A., 1968. Sur l'oxydation du moût de raisin. III. — Activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase au cours de la maturation du raisin des cépages *Muscat* rouge, *Dimiat*, *Riessling* et *Aligoté*. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 333-340.

Jones J. D., Hulme A. C., 1961. Preparation of mitochondria from the peel of apples. *Nature*, London, **191**, 370-372.

Keilin D., Hartree E. F., 1951. Purification of *Horse Radish* peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. *Biochem. J.*, **49**, 88-104.

Lance C., 1955. Sur la détermination de l'activité peroxydase des extraits bruts de tissus végétaux. *Rev. gén. Bot.*, **62**, 609-621.

Maehly A. C., Chance B., 1954. The assay of catalases and peroxidases. In Glick D., *Methods of biochemical analysis*, vol. **1**, 357-424. Inter-science Publishers. New York.

Maehly A. C., 1955. Plant peroxidase. In Colowick A. P., Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, vol. **2**, 801-813. Academic Press. New York.

March A., Feldmann A., 1957. Caractéristique biochimique des différentes sortes de vignes de la région d'Odessa et des produits qu'on en retire (en russe). *Vinod. Vinogr.*, (3), 15.

Monikowski C., Chmielnicka E., 1964. Le rôle de l'acide sulfureux dans le processus d'oxydation peroxydasique de l'acide L-ascorbique en présence de H_2O_2. *Rev. Ferment. Industr. alim.*, **19**, 113-120.

Morkovich M. S., Rikhter A. G., 1964. Activité enzymatique des raisins de Moldavie (en russe). *Tr. Mold. Nouchn. Issled. Inst. Pishch. Prom.*, **5**, 71-74.

Paul K. G., Avi-Dor Y., 1954. The assay of peroxidase with mesidine as the hydrogene donor. *Acta chem. scand.*, **8**, 649-657.

Polonovski J., 1964. Oxydo-réductases. In Javillier M., Polonovski M., Florkin M., Boulanger P., Le Moigne M., Roche J., Wurmser R., *Traité de biochimie générale*, vol. **2** (2), 566-678, Masson. Paris.

Poux C., 1965. Le produit de base : le raisin mûr. *Bull. techn. Inform.*, (196), 49-54.

Poux C., 1966. Polyphénoloxydase dans le raisin. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 149-158.

Poux C., 1967. Enzymes oxydatifs dans le raisin. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **5**, B 205-B 222.

Reddi R. R., Esselen W. B., Fellers J. R., 1950. Activité peroxydasique du tissu de pomme. *Food Technol.*, **4**, 63-68.

Reyes P., Luh B. S., 1960. Les enzymes caractéristiques du brunissement des pêches « *Fay elberta freestone* ». *Food Technol.*, **14**, 570-575.

Theorell H., Ehrenberg A., 1942. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* 15 B, (24) ; 16 A (2).

Theorell H., 1951. The iron-containing enzymes. B.- Catalases and peroxidases « Hydroperoxidases ». In Sumner J. B., Myrback K. *The enzymes*, vol. **2** (1), 397-427. Academic Press, New York.

Vetter J. L., Steinberg M. P., Nelson A. I., 1958. Quantitative determination of peroxidase in sweet corn. *J. agric. Food Chem.*, **6**, 39-41.

Wallerstein J. S., Alba R. T., Hale M. G., Levy H., 1947. Studies on oxydase activity in potato tubers. IV. A quantitative method for the determination of peroxidase. *Biochim. biophys. Acta*, **1**,327-333.

Wood C. B., Lopez A., 1963. Evaluation of quantitative methods of determining peroxidase in vegetables. *Food Technol.*, **17**, 131-133.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 69-72.

NOTE TECHNIQUE

FORMATION DU VINYLBENZÈNE LORS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DU RAISIN

C. JOURET, M. MOUTOUNET et P. DUBOIS *

Laboratoire de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Toulouse, I. N. R. A.,
B. P. 12, 31 - Castanet-Tolosan

* *Station de Technologie des Produits végétaux,*
Centre de Recherches, I. N. R. A.,
21034 - Dijon Cedex

Mots clés : *vinylbenzène, fermentation alcoolique, macération carbonique, raisin.*

Produit lors de la fermentation alcoolique du raisin, le gaz carbonique s'échappe des cuves en entraînant de la vapeur d'eau et des composés organiques volatils qui peuvent être condensés dans des pièges froids. Cette technique a été utilisée pour comparer deux modes de vinification en rouge : la mise en fermentation du raisin foulé (méthode classique) et la fermentation en macération carbonique du raisin non foulé.

Les analyses faites en chromatographie en phase gazeuse avaient permis de détecter un composé volatil présent en quantités beaucoup plus importantes dans les condensats de gaz émis par les cuves de macération carbonique (JOURET, MOUTOUNET, 1970, 1971).

Divers tests de caractérisation des groupes fonctionnels avaient permis de préciser qu'il s'agissait d'un hydrocarbure possédant au moins une liaison éthylénique. Par ailleurs son spectre de masse, obtenu en couplage chromatographe en phase gazeuse — spectromètre de masse, était sensiblement en accord avec celui du vinylbenzène ou styrène publié par STENHAGEN *et al.* (1969).

Ce spectre de masse présente cinq pics caractéristiques pour m/e = 104 (100 p. 100), m/e = 103 (75 p. 100), m/e = 78 (75 p. 100), m/e = 51 (58 p. 100) et m/e = 77 (41 p. 100), ce qui est en parfait accord avec le spectre obtenu sur le vinylbenzène témoin dans les mêmes conditions expérimentales (appareil Varian-Mat, type CH 5 ; source : 250°C — 70 *e*V — 100 μA). Par ailleurs, les volumes de rétention en chromatographie en phase gazeuse du composé inconnu sont ceux du vinylbenzène sur carbowax 20 M (phase polaire) et sur silicone SE 52 (phase apolaire).

Cependant une détermination complémentaire s'avérait nécessaire car, selon DUVAL (1936), le vinylbenzène « pur » ne réagit à froid ni avec le brome, ni avec le permanganate de potassium, alors que le composé inconnu est éliminé des chromatogrammes par action préalable de l'un ou l'autre de ces réactifs sur les échantillons d'analyse. Nous avons pu constater que le vinylbenzène

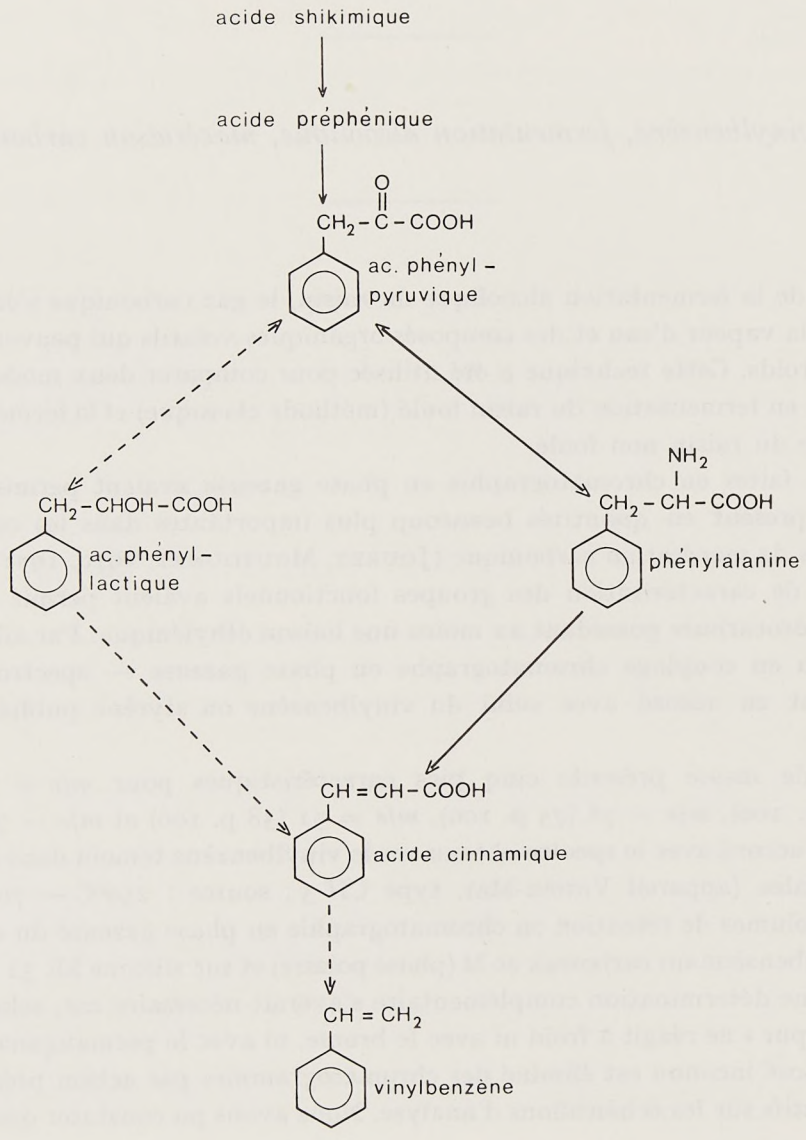
témoin réagit bien avec le brome et le permanganate de potassium à des concentrations voisines de celles de nos échantillons (de l'ordre de quelques p.p.m.). Le composé inconnu est donc bien le vinylbenzène.

A l'état naturel, ce composé est particulièrement abondant dans certaines essences de Styrax où il proviendrait, selon GUENTHER (1953), de la décarboxylation de l'acide cinnamique. Ce composé a été signalé plus récemment comme constituant volatil mineur du thé et du café (HEINS *et al.*, 1966), de la fumée de cigarette (GROB, 1965) et du whisky (KAHN *et al.*, 1968). Enfin, il a été identifié parmi les composés volatils du jus de raisin *Concord* par STEVENS *et al.* (1965) qui ont pensé qu'il s'agissait là d'une contamination d'origine inconnue. Cette même équipe de recherche, poursuivant son travail sur le même raisin, ne l'a d'ailleurs pas retrouvé par la suite (STERN *et al.*, 1967).

Sa présence naturelle dans les condensats des cuves de vinification des essais rapportés ici ne paraît pas contestable. L'ensemble des pièges est en acier inoxydable, munis de joints téflon, et durant trois campagnes les quantités retrouvées dans les cuves de vendanges non foulées ont toujours été nettement supérieures à celles des cuves de vendanges foulées.

Il est fort probable qu'il ne puisse correspondre qu'au produit de décarboxylation de l'acide cinnamique. C'est ce qui ressort des travaux d'OLIVIERO (1960) sur le métabolisme d'*Aspergillus niger* et de *Penicillium glaucum*, ainsi que de ceux de FINKLE *et al.* (1962) sur celui d'*Aerobacter aerogenes*.

De son côté, l'acide cinnamique se forme à partir de l'acide shikimique par l'intermédiaire



de la phénylalanine ou de l'acide phényllactique (Pridham, 1965). La biosynthèse du vinylbenzène peut donc s'établir comme le montre le schéma ci-contre.

Les conclusions de Hulme (1958) concernant la présence d'acide shikimique en quantités appréciables dans les tissus dont les processus métaboliques sont ralentis, et celles de Flanzy *et al.* (1967) sur l'accumulation des acides quinique et shikimique dans les raisins placés en anaérobiose, sont certainement à mettre en relation avec les quantités de vinylbenzène trouvées dans les gaz s'échappant des cuves de raisin vinifié selon la technique de macération carbonique.

Le vinylbenzène étant peu odorant et n'étant présent qu'à l'état de traces, ce n'est certainement pas lui qui est responsable de la flaveur particulière des vins obtenus par cette technique. Il reste cependant possible que l'acide shikimique soit le précurseur d'autres composés volatils, notamment de phénols, qui eux pourraient jouer un rôle déterminant sur l'arôme de ces vins.

Reçu pour publication en février 1972.

SUMMARY

PRODUCTION OF VINYLBENZENE DURING THE ALCOHOLIC FERMENTATION OF GRAPES

Volatile compounds darried off by CO_2 during vinification of crushed and uncrushed grapes (« Maceration carbonique ») where trapped in the cold. One of these compounds was found in much ligher concentration in the volatiles of the uncrushed grapes. It has been identified to vinylbenzene by chemical reactions, gas chromatography and mass spectrometric analysis; its possible origine is briefly discussed.

RESUMEN

FORMACION DEL VINILBENCENO DURANTE LA FERMENTACION ALCOHOLICA DE LA UVA

Los compuestos volátiles arrastrados por el CO_2 durante el transcurso de la vinificación de uvas pisadas y no pisadas (Maceración carbónica) han sido captados por el frio. Uno de estos compuestos ha sido encontrado en mayor proporción en los compuestos volátiles de las uvas no pisadas y ha sido identificado con el vinilbenceno por medio de análisis químicos, por cromatografia en fase gaseosa y por espectrometría de masa, siendo comentado su origen brevemente en este trabajo.

RIASSUNTO

FORMAZIONE DEL VINILBENZENE IN OCCASIONE DELLA FERMENTAZIONE ALCOOLICA DELL'UVA

I composti volatili che comporte il CO_2 durante la vinificazione di uva pigiata e non pigiata (macerazione carbonica) sono stati trattenuti mediante il freddo. Uno di questi composti è stato trovato in concentrazione molto più elevata nei composti volatili dell' uva non pigiata. Le analisi chimiche, cromatografia in fase gassosa e spettrometria di massa, hanno permesso di identificarlo come vinilbenzene. La sua origine è brevemente commentata.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUVAL C., 1936. Carbures benzéniques, in V. GRIGNARD : *Traité de Chimie organique*, **4**, 122-124, Masson, Paris.

FINKLE B. J., LEWIS J. C., CORSE J. W., LUNDI R. E., 1962. Cité par PRIDHAM, 1965.

FLANZY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. II. - Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16** (2), 89-107.

GROB K., 1965. Gas chromatography of cigarette smoke. III. - Separation of the overlapt region of gas and particulate phase by capillary columns. *J. Gas Chromatogr.*, **3**, 52-56.

GUENTHER E., 1953. *The essential oils*, **2**, 14-15, 4e édition. D. Van Nostrand Cy, Inc., Princeton, New Jersey.

HEINS J. T., MAARSE H., TEN NOEVER DE BRAUW M. C., WEURMAN C., 1966. Direct food vapour analysis and component identification by a coupled capillary GLC-MS arrangement. *J. Gas Chromatogr.*, **4**, 395-397.

HULME A. C., 1958. Quinic and shikimic acids in fruits. *Qual. Plant. Mater. veg.*, 468-473.

JOURET C., MOUTOUNET M., 1970. Comparaison des substances volatiles émises au cours de la vinification de raisins foulés et non foulés. *Ann. Technol. agric.*, **19** (1), 59-68.

JOURET C., MOUTOUNET M., 1971. L'arôme des vins de macération carbonique. in *Journées de Macération carbonique*, Avignon, 10-11 février 1971, 123-130, Institut national de la Recherche agronomique, 84 - Montfavet.

KAHN J. H., LAROE E. G., CONNER H. A., 1968. Wisky composition : identification of components by single-pass gas chromatography-mass spectrometry. *J. Food. Sci.*, **33**, 395-400.

OLIVIERO, 1906. Cité par DUVAL, 1936.

PRIDHAM J. B., 1965. Low molecular weight phenols in higher plants. in *Annual review of plant physiology*, **16**, 13-36.

STENHAGEN E., ABRAHAMSSON S., MC LAFFERTY F. W., 1969. *Atlas of mass spectral data*. Interscience Publishers, New York.

STERN D. J., LEE A., MC FADDEN W. H., STEVENS K. L., 1967. Volatiles from grapes ; identification of volatiles from *Concord* essence. *J. agr. Food Chem.*, **15** (6), 1100-1103.

STEVENS K. L., LEE A., MC FADDEN W. H., TERANISHI R., 1965. Volatiles from *Concord* essence. *J. Food Sci.*, **30** (6), 1106-1107.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 73-79.

NOTE TECHNIQUE

DÉTERMINATION DE LA MÉTHIONINE DANS LES LEVURES PAR HYDROLYSE ALCALINE ET COLORIMÉTRIE SPÉCIFIQUE

J. MAUGENET, Maria-Halina LIPIEC* et Marie-Laure DALMEYDA

Station d'Œnologie et de Technologie végétale I. N. R. A., 11104 - Narbonne

* *Instytut Przemystu Fermentacyjnego, Warszawa 12, Ul. Rakoviecka 36, Pologne*

RÉSUMÉ

Cette note décrit une technique dérivée de celle de Mc Carthy et Paille (1959). L'hydrolyse partielle est réalisée par la soude à 7,5 p. 100 à 115°C au bain d'huile pendant 30 minutes. Le test colorimétrique est basé sur la réaction de la méthionine avec le nitroprussiate de sodium en milieu alcalin suivie d'acidification.

Mots clés : *méthionine, hydrolyse alcaline, levures, colorimétrie.*

INTRODUCTION

La détermination de la méthionine dans les protéines est, en règle générale, très délicate. L'hydrolyse acide, en milieu chlorhydrique 6 N, couramment utilisée avant la détermination des acides aminés, ne convient pas toujours en raison de la fragilité de la méthionine (Adrian, 1963). En effet, si cette technique est applicable aux protéines hautement purifiées, elle ne peut l'être aux levures en raison de leur haute teneur en glucides (30 à 40 p. 100 du poids sec). On peut cependant protéger efficacement la méthionine en pratiquant un traitement oxydatif préalable, mais le temps nécessaire à la réalisation de cette opération est une entrave aux techniques d'analyse courante.

Au cours de notre expérimentation, nous avons appliqué aux levures une technique dérivée de celle de Mc Carty et Paille (1959) citée par Loiseleur (1963) ; cette méthode est basée sur une hydrolyse alcaline partielle suivie d'une colorimétrie spécifique.

I. — TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Nous avons effectué parallèlement sur les levures des hydrolyses acide et alcaline avec ou sans addition de méthionine. La méthionine a été ensuite déterminée sur ces hydrolysats par une méthode colorimétrique dont le principe est le suivant : formation d'une coloration rouge avec le nitroprussiate de sodium en milieu alcalin puis mesure spectrophotométrique à 510 nm en milieu acide.

Nous avons vérifié par cette méthode colorimétrique et par chromatographie en couche mince sur film (MAUGENET et DALMEYDA, 1969) que nous retrouvions seulement des traces de méthionine après hydrolyse acide des levures. A titre indicatif, la photographie d'un chromatogramme de cet hydrolysat est représentée figure 1.

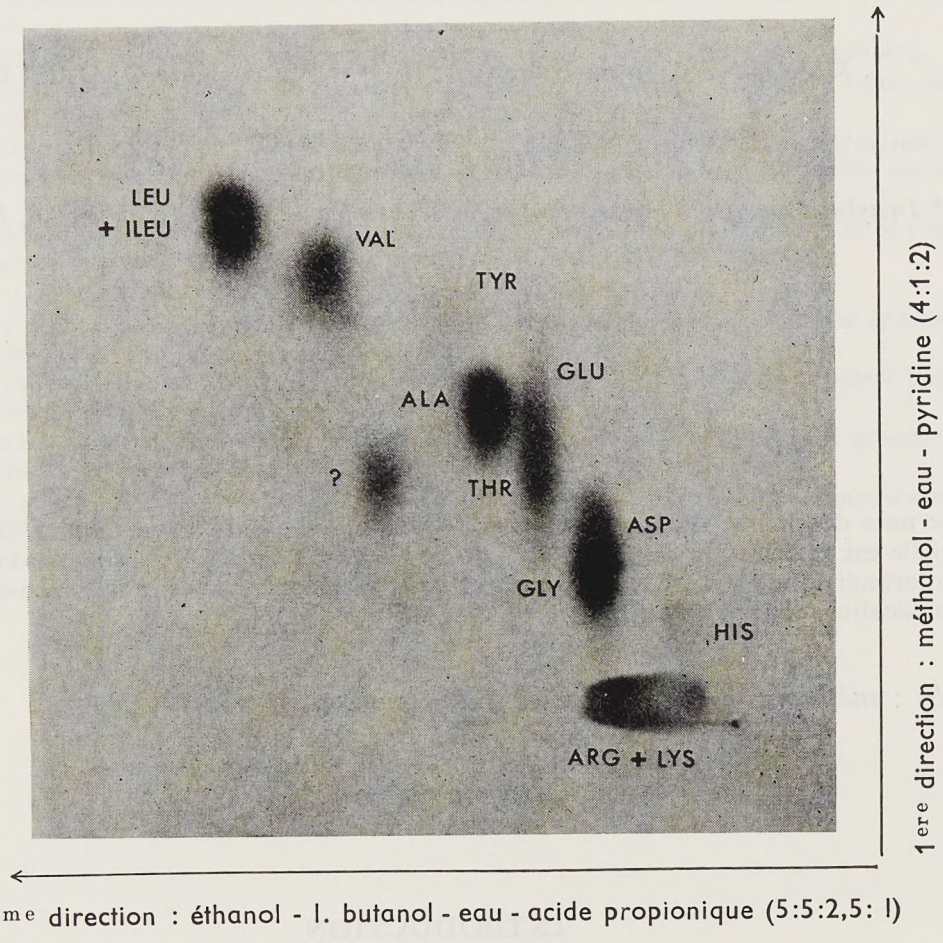


FIG. 1. — *Chromatogramme des acides aminés d'une levure après hydrolyse acide de 24 heures sous reflux en milieu HCl 6 N*

Hydrolysat de *Rhodotorula glutinis* (levure A) ;
film chromatographique « Eastman Chromagram Sheet », type ECS 6064,
couche organique de cellulose.

Hydrolyse alcaline

Les hydrolyses sont effectuées sur des levures séchées et pulvérisées par broyeurs à billes. Cinquante mg de levures, 1 ml d'eau bidistillée et 3 ml de NaOH à 10 p. 100 sont placés dans un tube scellé au bain d'huile à 115°C ; le tube est agité de temps en temps. Dans nos essais, nous avons fait varier le temps de digestion de 10 à 60 minutes. Les hydrolysats sont ensuite refroidis et centrifugés 5 minutes à 3 000 *g*.

Colorimétrie

Réactifs : solution de soude à 10 p. 100 ;
solution de nitroprussiate de sodium à 10 p. 100 ;
solution de glycine à 3 p. 100 ;
solution d'acide phosphorique à 85 p. 100.

Conservation : La solution de nitroprussiate de sodium peut se conserver en armoire frigorifique tandis que pour la solution de glycine la congélation est nécessaire.

Appareillage : Colorimètre Bausch et Lomb, Spectronic 20, tubes de 0,5 pouce de diamètre, lecture de la densité optique à 510 nm.

Réaction colorée : Elle s'effectue à température ambiante.

— 2 ml d'hydrolysat + 2 ml de solution de soude + 0,15 ml de solution de nitroprussiate de sodium ;
— agiter et attendre 10 minutes ;
— ajouter 1 ml de solution de glycine ;
— agiter et attendre 10 minutes ;
— ajouter 2 ml de solution d'acide phosphorique ;
— agiter et attendre 10 minutes.

L'addition de glycine empêche l'histidine, présente dans la levure, d'interférer avec la méthionine.

Après le développement de la réaction colorée et avant passage au colorimètre, il est parfois nécessaire, avec certaines levures, de filtrer sur filtre rapide pour éliminer l'opalescence qui se produit. La couleur est stable dans la limite de — 1 p. 100 de variation de D.O. au bout de 20 minutes et — 2 p. 100 de 30 à 60 minutes.

La courbe témoin est établie à partir d'une solution-mère dans l'eau bidistillée (1 mg par ml) de L-méthionine Fluka. La solution-étalon est préparée à partir de 1 ml d'une dilution connue de la solution-mère plus 3 ml de solution de soude et la réaction colorée est effectuée à partir de 2 ml de cette solution pour rester à la même dilution alcaline que l'hydrolysat.

II. — RÉSULTATS

Digestion des cellules

Quantité de levures mise en œuvre.

Dans nos essais, nous avons fait varier cette quantité de 15 à 50 mg et pour le même temps d'hydrolyse alcaline la quantité de méthionine dosée et rapportée au poids sec n'a pas varié d'un échantillon à l'autre. Nous avons conservé l'échantillonnage de 50 mg car il nous semble plus représentatif.

Temps de digestion.

Dans les résultats reportés figure 2, nous avons suivi la variation de la quantité de méthionine récupérée en fonction du temps d'hydrolyse : c'est au bout de 30 minutes que nous obtenons la quantité optimale de méthionine et nous en avons vérifié la reproductibilité. Dans le tableau 1, nous avons étudié la dispersion des résultats qui reste très faible et permet de conseiller cette méthode pour une évaluation quantitative.

Évaluation de la méthionine dans les extraits de levures

Des prises d'essai de 50 mg de levures provenant d'un lot homogène ont été enrichies en L-méthionine avant hydrolyse alcaline (30 mn à 115°C) ; les résultats du tableau 2 montrent la fidélité de cette technique.

Nous avons, d'autre part, soumis les hydrolysats au test qualitatif des acides aminés par

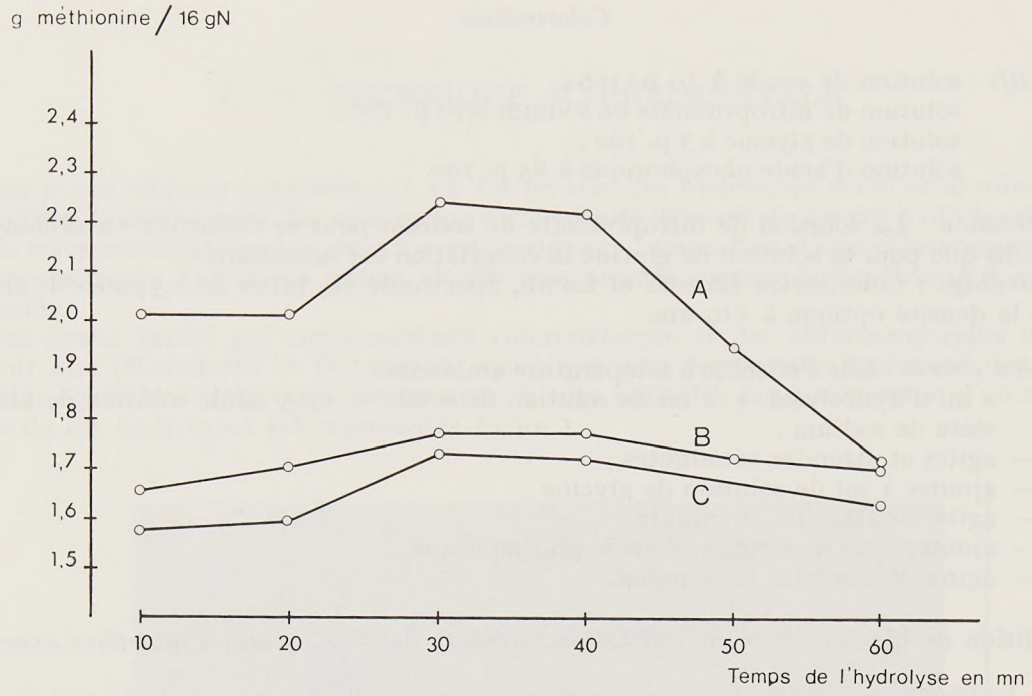


FIG. 2. — *Variation de la méthionine dosée dans les levures en fonction du temps d'hydrolyse alcaline à 115°C en milieu NaOH 7,5 p. 100.*

Levure A = *Rhodotorula glutinis*, cultivée sur vinasse de vin.
Levure B = *Saccharomyces cerevisiae*, levure de récupération de brasserie.
Levure C = *Saccharomyces lactis*, cultivée sur lacto-sérum.

chromatographie en couche mince sur film ; le chromatogramme obtenu est représenté figure 3 : la tache de méthionine est dominante, celles d'acide aspartique + glycine et alanine sont faibles et celles de sérine, leucine + isoleucine, arginine + lysine à l'état de traces. L'hydrolyse alcaline des levures peut donc être considérée comme partielle.

En tenant compte du temps d'hydrolyse, la durée totale de la détermination de la méthionine par colorimétrie spécifique est de 1 heure 15 minutes. Cette technique peut donc rendre de

TABLEAU I

Variabilité des résultats obtenus avec des quantités identiques de levures (50 mg) *pour un temps d'hydrolyse alcaline de 30 minutes*

Échantillon	Méthionine en g/16 g N	
1	1,71	
2	1,72	
3	1,69	$\mu = 1,73$
4	1,77	$s = 0,035$
5	1,73	
6	1,78	

Essais effectués sur un lot homogène de *Saccharomyces lactis* (levure C).

grands services lorsqu'au cours d'une expérimentation on a besoin d'une évaluation rapide de la méthionine dans un produit non purifié, et ceci avec une précision suffisante.

Dans les conditions de notre technique, la réaction de la méthionine est sensible à 20 μg

TABLEAU 2

Dosage de la méthionine dans des échantillons d'un même lot de levures enrichies en L-méthionine avant hydrolyse alcaline

Prise d'essai	Méthionine dosée dans la prise d'essai (μg)
50 mg levures + 1 ml H_2O	413
50 mg levures + 1 ml sol. méthionine (500 μg) ...	916
50 mg levures + 1 ml sol. méthionine (250 μg)	670
50 mg levures + 1 ml sol. méthionine (100 μg) ...	511

Analyses effectuées sur *Saccharomyces lactis* (levure C).

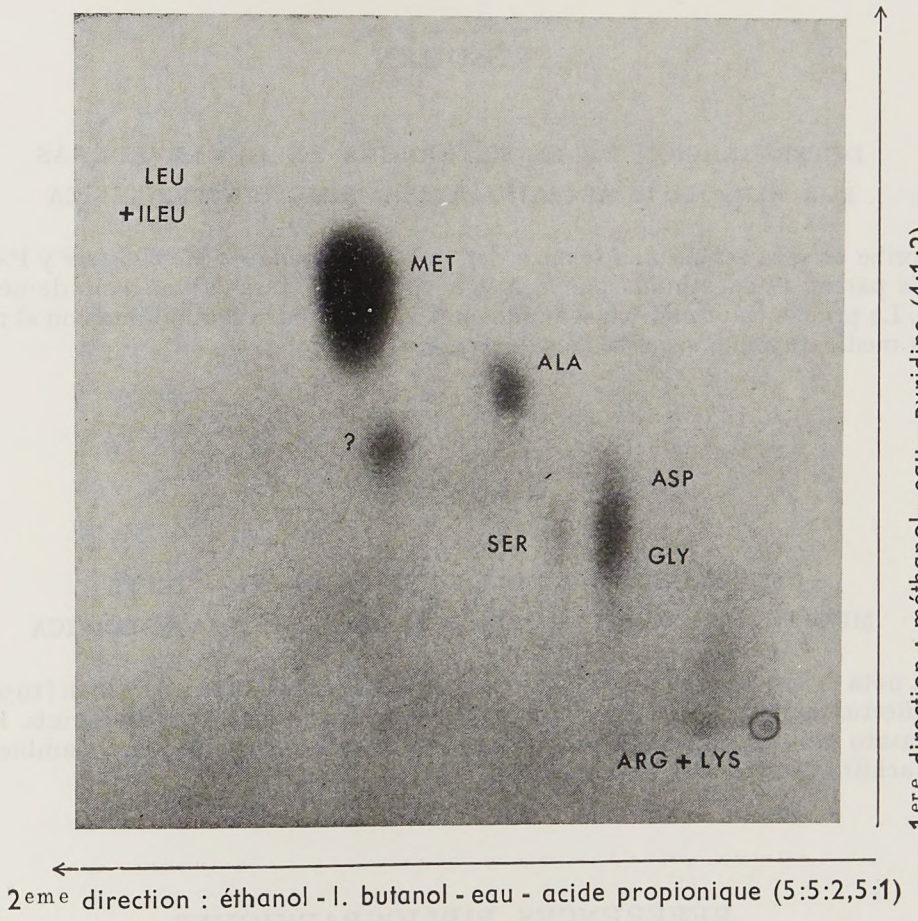


FIG. 3. — *Chromatogramme d'un hydrolysat de levure après hydrolyse alcaline de 30 minutes à 115°C en milieu NaOH 7,5 p. 100.*
Hydrolysat de *Rhodotorula glutinis* (levure A) ;
film chromatographique « Eastman Chromagram Sheet », type ECS 6064, couche organique de cellulose.

dans la prise d'essai de 2 ml soit 0,08 p. 100 par rapport au poids sec de la levure. Elle est d'autre part conforme à la loi de Beer jusqu'à des teneurs pouvant atteindre 1 000 µg de méthionine dans la prise d'essai (DO < 0,500) ce qui représenterait une teneur égale à 4 p. 100 du poids sec de la levure.

Cette réaction présente une grande spécificité. Nous avons vérifié qu'elle était négative pour la cystine, le chlorhydrate de cystéine et le glutathion ; Mc Carthy et Sullivan (1941) signalent cependant que si elle est négative pour la méthionine sulfoxyde elle est positive pour la glycylméthionine.

Reçu pour publication en avril 1972.

SUMMARY

A COLORIMETRIC DETERMINATION OF THE METHIONINE CONTENT OF YEASTS

This technical note describes the use of a procedure derived of Mc Carthy and Paille (1959). The partial hydrolysis is accomplished with 7,5 p. 100 sodium hydroxyde in an oil bath at 115°C for 30 minutes. A colorimetric test is presented, based on the reaction of methionine with sodium nitroprusside in an alkaline medium followed by acidification.

RESUMEN

DETERMINACION DE LA METHIONINA EN LAS LEVADURAS POR HIDROLISIS ALCALINA Y COLORIMETRIA ESPECIFICA

Se describe en esta reseña una técnica derivada de aquella de Mc Carthy y Paille (1969). La hidrólisis parcial es conseguida por la sosa a 7,5 p. 100, i 115°C en bano de aceite durante 30 minutos. La prueba colorimétrica se funda en la reacción de la methionina con el nitroprusiato de sodio en medio alcalino, seguida de acidificación.

RIASSUNTO

DETERMINAZIONE DELLA METIONINA NEI LIEVITI MEDIANTE IDROLISI ALCALINA E COLORIMETRIA SPECIFICA

Questa nota descrive una tecnica derivata da quella di Mc Carthy e Paille (1959). L' idrolisi parziale è effettuata dalla soda a 7,5 p. 100, a 115°C, in bagno d'olio per 30 minuti. Il test colorimetrico è basato sulla reazione della metionina con il nitroprussiato di sodio in ambiente alcalino, seguita da acidificatione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adrian J., 1963. La réaction de Maillard. II. — Étude du comportement de six acides aminés purs. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **17** (2), 1-35.

Loiseleur J., 1963. *Techniques de laboratoire*, tome 1, fasc. 2, 1118-1119. Masson, Paris.

Mc Carthy T. E., Sullivan M. X., 1941. A new and highly specific colorimetric test for methionine. *J. Biol. Chem.*, **141**, 871-876.

Mc Carthy T. E., Paille S. M. M., 1959. A rapid determination of methionine in crude proteins. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **1**, 29-33.

Maugenet J., Dalmeyda M.-L., 1969. Séparation des acides aminés par chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur film. *Ann. Technol. agric.*, **18** (3), 237-240.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (1), 81-93.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

LES ENZYMES ET LA QUALITÉ DES PÊCHES

J.-C. PECH et J. FALLOT

Laboratoire de Technologie végétale,
École nationale supérieure agronomique,
31 - Toulouse

RÉSUMÉ

Les enzymes intervenant dans la qualité des pêches sont passées en revue et les moyens de contrôle envisagés.

Les enzymes pectolytiques (PME et PG) jouent un rôle important dans l'amollissement et dans l'apparition de la texture cotonneuse. Il est possible de retarder l'apparition de cette dernière à l'aide de techniques particulières de conservation.

Les enzymes intervenant dans le brunissement (phénoloxydases et peroxydases) ont été particulièrement étudiées chez la pêche, sur les plans théorique et appliqué. Les facteurs susceptibles de réduire le brunissement sont envisagés ; ils intéressent les producteurs et les industriels de la transformation.

Mots clés : *enzymes, pêche, qualité.*

INTRODUCTION

Les enzymes jouent un rôle dans la plupart des processus biochimiques intervenant au cours de la maturation des fruits et de leur conservation par le froid (Ulrich et Hartmann, 1967). Elles peuvent permettre l'acquisition de caractères souhaités (texture, flaveur...) ou indésirables (texture désagréable, brunissement, décoloration...). Leur influence est analysée dans des revues récentes consacrées à la qualité des végétaux comestibles et en particulier des fruits et légumes, transformés ou non (Aylward et Haisman, 1969 ; Cordonnier, 1971 ; Schwerdtfeger, 1971).

Dans le cas de la pêche, les études relatives aux diverses activités enzymatiques ne sont pas nombreuses. Dans leur mise au point, Romani et Jennings (1971) ne citent qu'un petit nombre de travaux ; mais les références rapportées dans leur bibliographie ne sont pas postérieures à

1968. Depuis, des études intéressantes ont été publiées portant sur les enzymes pectolytiques et celles qui interviennent dans le brunissement. Nous nous proposons de les analyser.

I. — LES ENZYMES PECTOLYTIQUES

L'amollissement des fruits charnus, qui constitue un caractère de leur maturation, a souvent été mis en parallèle avec l'évolution des composés pectiques. Il est vraisemblable que ce phénomène dépend aussi de la turgescence des cellules, de la taille de celles-ci et d'autres composés que les pectines (cellulose...). Mais il est admis maintenant que l'acquisition de la maturité s'accompagne d'une solubilisation de précurseurs insolubles appelés protopectines. Le mécanisme de ces réactions n'est pas élucidé. Toutefois, le critère dureté a une telle importance pour la pêche qu'il est bon de rassembler les données relatives à de tels processus.

D'autre part, la conservation de la pêche à basse température est habituellement limitée à une quinzaine de jours. Au-delà, à 0°C par exemple, on assiste à un changement de la texture de la pulpe qui devient fibreuse, « cotonneuse » (woolliness, woolly breakdown) ; en même temps, elle perd sa « jutosité » et sa flaveur. Ces phénomènes sont si intenses qu'après 4 ou 5 semaines aucun des fruits stockés n'est comestible. Cette maladie physiologique de conservation, depuis 1957, est attribuée au métabolisme des substances pectiques (De Haan, 1957).

L'étude des enzymes pectiques est enfin justifiée par l'importance du caractère dureté pour les pêches de conserverie. Celles-ci doivent être fermes et le rester pendant la fabrication.

A. — *Les enzymes*

Deux types d'enzymes doivent être considérés.

1. *Les enzymes déméthoxylantes.*

Les pectine-méthylestérases (PME) ou pectine-pectylhydrolases, répertoriées sous le numéro 3.1.1.11 dans la classification internationale des enzymes (Barmann, 1969), hydrolysent les radicaux méthyl des substances pectiques selon la réaction :

$$\text{pectine} + n\ H_2O = n\ \text{méthanol} + \text{pectate}.$$

2. *Les enzymes dépolymérisantes.*

Elles hydrolysent les liaisons α 1,4 des polygalacturonides. Une nouvelle classification de ces enzymes (Koller, 1966) distingue celles agissant sur les pectines (polyméthylgalacturonases, PMG, et pectine-*trans*-éliminases, PTE) et celles agissant sur les acides pectiques (polygalacturonases, PG, et acide pectique *trans*-éliminases, PATE). Selon qu'elles dégradent les chaînes pectiques au hasard ou en position terminale, ces enzymes sont affectées du préfixe *endo* ou *exo*. Il faut reconnaître que chez les fruits la caractérisation de telles enzymes est peu avancée ; c'est chez le raisin que les données sont les plus précises (Marteau, 1967). La plus connue est de toute façon l'*endo*-polygalacturonase : poly α 1,4-galacturonide glycanohydrolase, EC 3.2.1.15.

Au cours de la maturation de la pêche, le degré d'estérification des pectines diminue. Les PME sont vraisemblablement responsables de cette déméthoxylation (Shewfelt, 1965 ; Ben Arie et Lavee, 1971). Dans ce fruit, l'activité PME est beaucoup plus faible que chez la poire ou l'avocat (Ben Arie et Lavee, 1971).

La solubilisation des pectines peut être attribuée à l'action de polygalacturonases. Cependant, chez la pêche, aucune activité de telles enzymes n'avait été décelée par Mc Cready et Mc Comb (1954), ni par Ben Arie et Lavee (1971). Mais en modifiant les conditions d'extraction par addi-

tion au milieu de substances protectrices dont on connaît le rôle déterminant dans la mise en évidence des enzymes des fruits (Pech *et al.*, 1970 *a* et *b*), Pressey *et al.* (1971) ont réussi à montrer l'existence d'une activité polygalacturonasique dans les pêches *Elberta* et *Red Haven* (fig. 1).

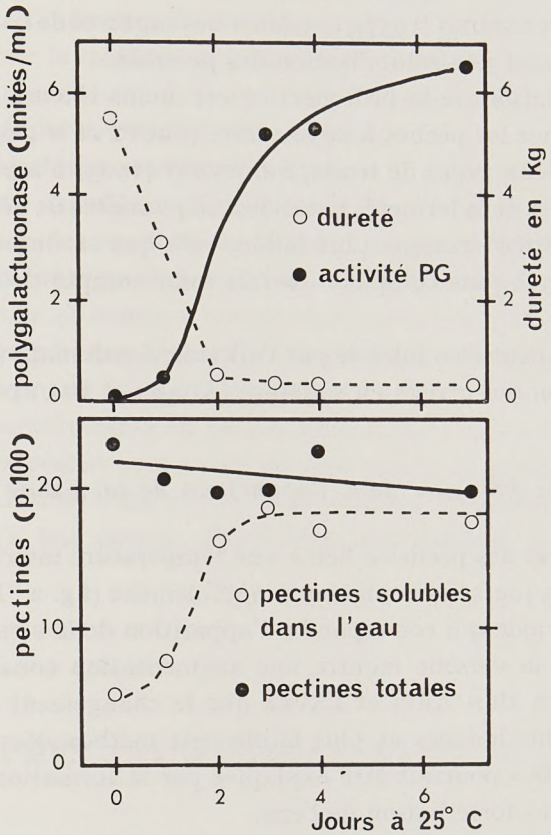


Fig. 1. — *Variations de la dureté, de l'activité polygalacturonasique, des pectines solubles dans l'eau et totales de pêches* Red Haven *pendant la conservation à 25°C* (Pressey *et al.*, 1971. *J. Food Sci.*, **36**, 1070-1073 ; Copyright by Institute of Food Technologists. Reproduction autorisée).

B. — *Rôle des enzymes pectiques dans l'amollissement de la pêche*

Au cours de la maturation normale des pêches *Elberta* conservées à 8°C, l'activité PME atteint un maximum après 12 jours et décroît brusquement ensuite (fig. 2). Ce phénomène entraîne

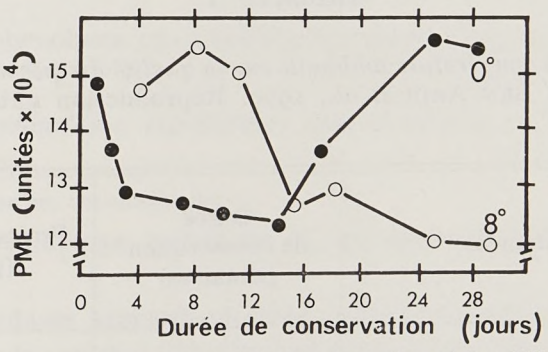


Fig. 2. — *Activité de la pectine-méthylestérase* (PME) *dans des pêches* Elberta *conservées à 0°C et 8°C* (Ben Arie et Lavee, 1971. *Phytochemistry*, **10**, 531-538, Reproduction autorisée)

une réduction du degré d'estérification et une augmentation du nombre de groupements carboxyliques libres. La diminution du nombre de groupements esters saponifiés contribue à la solubilisation des pectines. Toutefois, il est vraisemblable que le rôle essentiel des PME est de faciliter l'attaque des chaînes galacturoniques par les PG.

En effet, selon PRESSEY *et al.* (1971), la fermeté des pêches ne diminue rapidement qu'après l'apparition des PG. Ce résultat concerne aussi bien les fruits mûris sur l'arbre que les fruits cueillis (fig. 1).

Signalons que les variations du pH du fruit, dues à la diminution de la teneur en acides organiques, pourraient, selon DOESBURG (1957), entraîner des ruptures de liaisons cationiques, essentiellement calciques, déterminant une solubilisation des pectines.

On sait que la dégradation de la protopectine est moins intense au cours de la maturation chez la pêche *Pavie* que chez les pêches à noyau libre (SOUTY *et al.*, 1967).

Cependant, chez ces deux types de fruits, SHEWFELT (1965) n'a pas trouvé de relation entre l'activité de la pectinestérase et la fermeté. Parmi les cinq variétés de pêches à noyau libre étudiées, *Elberta* a une activité pectinestérasique plus faible, bien que sa dureté ne soit pas supérieure à celle des autres. Une analyse plus complète devrait tenir compte de l'activité polygalacturonasique.

La polygalacturonase peut être inhibée par l'alkyl-aryl-sulfonate (Nacconal) utilisé avec succès pendant la conservation des cerises en saumure (ADAMS et BLUNDSTONE, 1971).

C. — *Rôle des enzymes pectiques dans l'apparition de la texture cotonneuse. Prévention*

Lorsque la conservation des pêches a lieu à une température inférieure à 8°C, l'activité PME est inhibée pendant 12 à 15 jours, puis augmente notablement (fig. 2 ; BEN ARIE et LAVEE, 1971). Pendant cette dernière période qui correspond à l'apparition de la structure fibreuse de la pulpe, la fraction insoluble dans le versène montre une augmentation considérable. Ce fait, ajouté à d'autres données, suggère à BEN ARIE et LAVEE que le changement de texture observé est dû à des chaînes pectiques plus longues et plus faiblement méthoxylées que dans le cas de fruits sains. La perte de « jutosité » pourrait être expliquée par la formation d'une structure analogue à un gel entraînant une plus forte liaison de l'eau.

Les résultats intéressants de BEN ARIE et LAVEE (1971) demandent à être complétés par l'étude de l'activité des PG de pêches au cours de leur séjour à 0°C.

D'un *point de vue pratique*, la découverte d'un moyen susceptible de prolonger la conservation au froid de la pêche sans apparition de la texture fibreuse présente un grand intérêt.

Depuis longtemps, il a été établi qu'un séjour de 24 heures à 21°C après la cueillette et avant la mise au froid à 0°C est très bénéfique (DAVIES *et al.*, 1938 ; FISHER *et al.*, 1943 ; BOYES, 1955).

TABLEAU I

Effet d'expositions répétées à température ambiante sur la qualité des pêches Elberta *conservées à 0°C* (d'après BEN ARIE *et al.*, 1970. Reproduction autorisée)

Traitement	Durée de conservation (semaines)	Fruits cotonneux (p. 100)
60 h à température ambiante avant conservation à 0°C	4	56
	5	98
48 h à température ambiante après 2 semaines à 0°C	5	78
	6	100
48 h à température ambiante après 2 et 4 semaines à 0°C	5	20
	6	40

Guelfat-Reich *et al.* (1966) ont précisé les facteurs de ce conditionnement préalable. La température de 25°C est à préférer à celle de 17 ou 21°C. La durée de 24 heures est insuffisante et doit être portée au moins à 48 heures ; des séjours de 60 à 72 heures ont même tendance à améliorer encore cet effet. Le stade de maturité à la cueillette est peut-être le facteur le plus important : moins le fruit est mûr, plus l'influence du conditionnement est bénéfique. On peut cependant éprouver quelques craintes sur la qualité organoleptique de pêches trop immatures ainsi traitées et conservées plusieurs semaines à 0°C. L'activité PME de tels fruits est analogue, au cours de la conservation, à celle de fruits mûrissant normalement.

Toutefois, un autre traitement semble plus efficace. Il consiste à exposer les pêches à 23-25°C pendant 48 heures après des séjours de 2 et 4 semaines de conservation à 0°C (Ben Arie *et al.*, 1970). Le tableau 1 montre les résultats d'une telle expérience portant sur des pêches *Elberta* cueillies à un stade relativement avancé de maturité. Après 5 semaines de conservation, les fruits ayant subi deux expositions de 48 heures à température ambiante restent sains à 80 p. 100 ; ceux qui sont restés 60 heures à température ambiante avant la mise au froid sont cotonneux à 56 p. 100 après quatre semaines, à 98 p. 100 après 5 semaines.

L'étude des enzymes pectolytiques de pêches ainsi traitées n'a pas été effectuée. De même, l'évolution de la texture des pêches conservées en atmosphère contrôlée n'a pas été analysée en relation avec les diverses activités PME et PG. Il est à noter à ce propos que, jusque-là, l'emploi d'atmosphères modifiées n'a pas permis d'améliorer notablement la conservation des pêches (Wankier *et al.*, 1970).

II. — LES ENZYMES INTERVENANT DANS LE BRUNISSEMENT

Après blessure naturelle ou produite lors de la préparation des « oreillons » et des jus, les pêches brunissent. Ce phénomène préjudiciable à la qualité met en jeu des enzymes, leurs substrats et certains facteurs physiques et chimiques. La connaissance des conditions d'apparition du brunissement doit permettre le contrôle et la prévention de celui-ci pendant la conservation et la transformation.

A. — *Les enzymes*

1. Les *phénoloxydases.*

Appelées également phénolases ou polyphénoloxydases, elles comprennent plusieurs types d'enzymes :

a) *des o-diphénol-O_2-oxydoréductases,* répertoriées sous le numéro 1.10.3.1. dans la classification internationale des enzymes.

A l'intérieur de ce groupe, on distingue :

— des phénoloxydases du type tyrosinase (1), qui peuvent oxyder des phénols monohydroxylés ;

— des polyphénoloxydases proprement dites, appelées couramment catécholoxydases (1), qui sont capables d'oxyder le catéchol (dihydroxyphénol) ou des composés de ce type.

b) *des p-diphénol-O_2-oxydoréductases* (EC 1.10.3.2.) ou *laccases.* Ces enzymes sont actives sur les diphénols en position *para,* mais n'oxydent pas les monophénols. Elles se distinguent également des autres phénoloxydases par leurs propriétés différentes vis-à-vis de certains inhibiteurs et de certains substrats (Mayer *et al.*, 1964).

(1) Non répertoriées en tant qu'enzymes spécifiques dans la classification internationale des enzymes (Barmann, 1969).

Un des caractères communs à ces deux groupes d'enzymes est la présence de cuivre dans leur groupement prosthétique.

2. Les *peroxydases*.

(Hydrogène peroxyde oxydoréductases ; EC 1.11.1.7.). Elles peuvent oxyder également certains composés phénoliques en présence d'eau oxygénée selon la réaction :

$$\text{donneur} + H_2O_2 \longrightarrow \text{donneur oxydé} + H_2O.$$

Les donneurs peuvent être des phénols tels que le catéchol, le pyrogallol, le gaïacol, l'hydroquinone...

Les peroxydases ont du fer dans leur groupement prosthétique.

Dans les pêches, les trois types d'enzymes existent (EC 1.10.3.1. ; EC 1.10.3.2. et EC 1.11.1.7.), mais leur localisation à l'intérieur de la cellule est différente. Les catécholoxydases sont situées dans les chloroplastes et dans les mitochondries alors que la laccase, soluble, se trouve vraisemblablement dans le protoplasme (Mayer *et al.*, 1964). Les peroxydases sont en général abondantes au niveau des tissus conducteurs. Dans certains parenchymes de réserve, l'activité peroxydasique est peu importante (Czaninski et Catesson, 1969). Certains auteurs ont décrit des organites cellulaires riches en peroxydases, les peroxysomes.

Des expériences préliminaires effectuées par Constantinides et Bedford (1967) ont montré que des pêches de variété indéterminée contiennent au moins trois formes de phénoloxydases.

Cinq phénoloxydases de pêches, variété *Salvey*, ont été séparées et purifiées récemment par électrophorèse en gel d'amidon et chromatographie sur DEAE- cellulose (Harel et Mayer, 1970).

Les pêches de variété *Cortez*, à noyau adhérent, contiennent elles aussi plusieurs enzymes à activité phénoloxydasique séparées en gel de polyacrylamide et purifiées par chromatographie sur DEAE- cellulose (Wong *et al.*, 1971 *a*). Ces enzymes diffèrent par leur sensibilité à la chaleur. Aucune d'entre elles n'agissant sur les monophénols, elles doivent être rangées parmi les catécholoxydases typiques. Ceci les distingue des phénoloxydases de champignons et de la pomme de terre qui peuvent oxyder les monophénols et les diphénols. Ces quatre enzymes sont inégalement sensibles aux inhibiteurs ($NaHSO_3$, acide ascorbique et glutathion). Une d'entre elles est même insensible.

Il se peut que cette multiplicité d'isoenzymes corresponde à des unités plus ou moins polymérisées de la même enzyme comme cela est le cas chez la pomme (Harel et Mayer, 1968).

Une laccase a été isolée et purifiée 160 fois à partir de pêches *Elberta* et *Orley* (Mayer et Harel, 1968). Elle se distingue des phénoloxydases par plusieurs caractères :

— elle n'est pas inhibée par le 2-3 naphtalènediol contrairement aux catécholoxydases ;

— elle est beaucoup moins inhibée que les phénoloxydases classiques par la phénylthiourée, le DIECA (diéthyldithiocarbamate) et l'oxyde de carbone ;

— elle peut oxyder le quinol (hydroquinone) et la *p*-phénylènediamine.

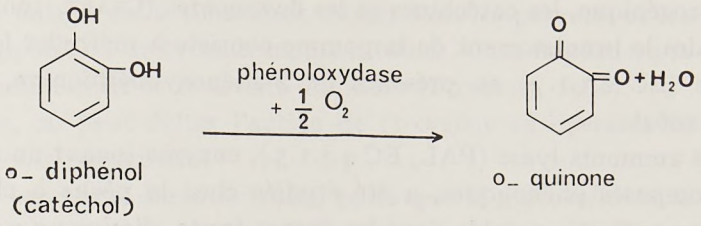
Chez la pêche, une activité peroxydasique a été mise en évidence par Reyes et Luh (1966). Elle a un pH optimum plus bas que celui des phénoloxydases (4,6 à 4,8 contre 5,9 à 6,3). A pH 3,8 (pH du fruit), la peroxydase conserve 41 p. 100 de son activité alors que la phénoloxydase n'en conserve que 9 p. 100. On pourrait donc conclure que la peroxydase pourrait être l'enzyme normale du brunissement des pêches. Cependant, il est très possible que le pH d'environnement de l'enzyme *in vivo* soit différent de celui du tissu broyé.

La peroxydase aurait en outre chez la pêche une activité plus grande que la phénoloxydase (6 fois plus grande en présence de gaïacol comme substrat). Cependant le fonctionnement des peroxydases nécessite de l'eau oxygénée et leur rôle dans le brunissement des fruits est incertain. Dans la suite de cette mise au point, seules seront envisagées les phénoloxydases.

B. — *Mécanisme du brunissement*

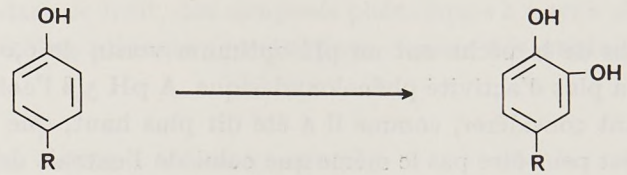
Si les premières étapes de l'oxydation des phénols sont relativement bien connues, il n'en est pas de même des séquences ultérieures conduisant aux produits bruns.

L'oxydation des phénols par les phénoloxydases peut être schématisée ainsi :



o- diphénol (catéchol) — o- quinone

Dans le cas de l'oxydation des monophénols par la tyrosinase, il y a hydroxylation préalable :



monophénol (tyrosine) — o- diphénol

Par la suite, ont lieu des oxydations et des arrangements intermoléculaires vraisemblablement non enzymatiques ; enfin, se produit une polymérisation des dérivés oxydés en composés bruns du type mélanine. Un schéma général du mécanisme du brunissement enzymatique est fourni par Braverman (1963).

C. — *Appréciation du brunissement*

Les techniques de mesure du brunissement des fruits sont exposées en détail par Macheix (1970).

La méthode la plus simple et la plus pratique consiste à utiliser un réflectomètre (Harel *et al.*, 1966). La « réflectance » est mesurée directement sur des tranches.

Le test au catéchol est un moyen rapide d'apprécier l'aptitude au brunissement de tranches ou de purées de fruits (Ponting, 1960).

La mesure du brunissement de broyats de fruits au colorimètre (440 à 500 nm) permet d'apprécier un brunissement « actuel » sans modification de la teneur naturelle en substrats et un brunissement « potentiel » pour la mesure duquel est utilisé un grand excès de substrat.

D. — *Facteurs intervenant dans le brunissement*

Selon certains auteurs, les tissus vivants ne pourraient pas être le siège de phénomènes de brunissement en raison d'une localisation différente des phénols (vacuole) et des oxydases (protoplasme ou organites). S'il en est ainsi, le brunissement serait la conséquence de la mort des cellules.

1. *Substrats.*

Pendant la croissance de la pomme, l'intensité du brunissement enzymatique semble liée à deux facteurs essentiels : la teneur en acide chlorogénique et l'activité des phénoloxydases ; le maximum d'influence de ces deux facteurs survient successivement dans le temps (Macheix, 1970).

Dans les pêches congelées, il y a relation directe entre la teneur en tanins oxydables et le degré de brunissement des fruits. Dans les fruits où la teneur en phénols oxydables est faible (pêche *Sunbeam*), le brunissement est peu important bien que l'activité enzymatique soit normale (Guadagni *et al.*, 1949). Signalons que chez les pommes et les poires ces faits ne sont que partiellement confirmés (Weurman et Swain, 1953 ; Harel *et al.*, 1966).

Dans les pêches *Elberta*, les substrats naturels sont par ordre d'importance : les leucoanthocyanines, l'acide chlorogénique, les catéchines et les flavonoïdes (Craft, 1961). Un moyen théorique élégant de réduire le brunissement de la pomme consiste à méthyler les substrats à l'aide d'*o*-méthyltransférase (EC 2.1.1. *a*) en présence de S-adénosylméthionine, de Mg^{++} ou Co^{++} (Nelson et Finkle, 1964).

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5.), enzyme jouant un rôle important dans la biosynthèse des composés phénoliques, a été étudiée chez la pêche à chair blanche *Okubo* (Aoki *et al.*, 1971). Son activité, notable dans les jeunes fruits, diminue au cours de la maturation.

2. *pH.*

Les phénoloxydases de la pêche ont un pH optimum voisin de 6,0 (Reyes et Luh, 1966). A pH 2,6 ou 2,7 il n'y a plus d'activité phénoloxydasique. A pH 3,8 l'activité de ces enzymes est faible. Il faut cependant considérer, comme il a été dit plus haut, que le pH d'environnement des enzymes *in vivo* n'est peut-être pas le même que celui de l'extrait de pulpe.

On sait que l'addition d'acides organiques est pratiquée couramment pour éviter le brunissement des fruits congelés.

3. *Chaleur.*

Comme toutes les enzymes, les phénoloxydases sont sensibles à la chaleur. A 55°C, trois des quatre phénoloxydases des pêches à noyau adhérent sont inactivées à des taux variables (fig. 3, Wong *et al.*, 1971 *a*). Mais il s'agit là d'enzymes purifiées.

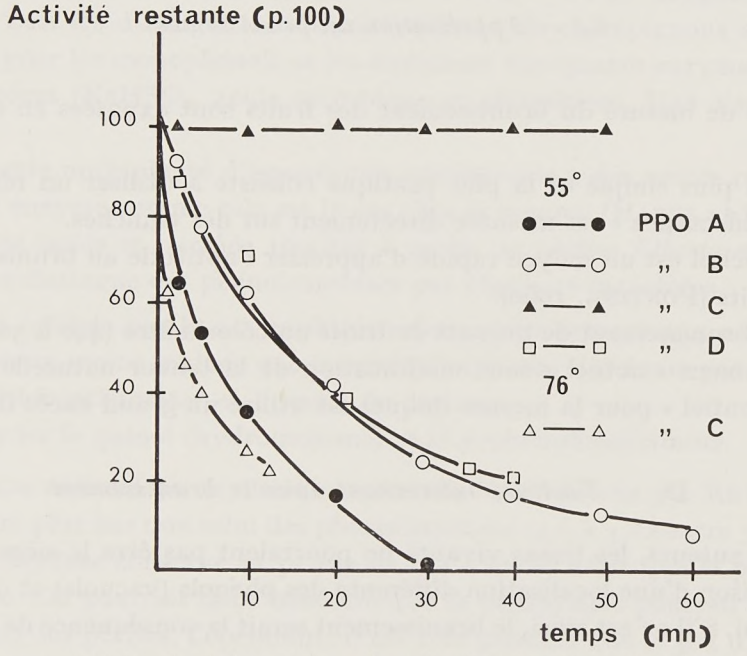


Fig. 3. — *Activité de 4 isoenzymes de polyphénoloxydase de pêches* Cortez *après action d'une température de* 55°C (ou 76°C) *pendant des temps variables* (Wong *et al.*, 1971. *Plant. Physiol.*, **48**, 19-23. Reproduction autorisée)

Dans le fruit entier ou en purée se trouvent des agents protecteurs, de sorte que la température d'inactivation est plus élevée (Ponting, 1960).

Dans l'industrie, la pratique du blanchiment est bien connue pour détruire les phénoloxydases et éviter le brunissement.

4. *Facteurs chimiques favorisant le brunissement.*

L'oxygène est nécessaire pour que les réactions d'oxydation se produisent. Le contact de tranches de fruits avec l'air favorisera donc grandement le brunissement. De plus, la teneur en oxygène des organes entiers est à considérer. Ainsi, dans les pommes et les poires, elle est élevée et peut favoriser l'apparition de brunissements internes. Chez la pêche, par contre, elle est faible et les risques de brunissement se trouvent diminués (Ponting, 1960).

Dans l'industrie, on peut éviter l'action de l'oxygène en opérant sous atmosphère neutre ou en présence d'agents réducteurs.

Des substances présentes dans les fruits, telles que le glycocolle ou la proline, forment avec les quinones, issues de l'oxydation des phénols, des composés très colorés de couleur brun-rouge (Pierpoint, 1966). Si la proline augmente dans des proportions importantes au cours de la maturation de certaines poires (Ulrich et Thaler, 1955 ; Pech *et al.*, 1970) il n'en est pas de même de la pêche. Par contre, dans ce fruit, des composés phénoliques à noyau phloroglucinol ou résorcinol peuvent réagir avec les quinones formées pour donner des produits intensément colorés (Wong *et al.*, 1971 *b*).

5. *Facteurs chimiques inhibant le brunissement.*

L'acide ascorbique est un inhibiteur naturel du brunissement chez les fruits. Il agit en réduisant les quinones formées et, selon Pierpoint (1966), il aurait également une action inhibitrice directe sur les phénoloxydases. Les acides L-ascorbique et D-isoascorbique ont le même pouvoir antioxydant sur les pêches (Reyes et Luh, 1960).

Les réactifs contenant du soufre (SO_2, thiourée, cystéine, glutathion...) forment généralement des dérivés d'addition avec les quinones, ce qui empêche la polymérisation de ces dernières en produits bruns. Les composés soufrés réduisent également l'activité des phénoloxydases (Embs et Markakis, 1965 ; Pierpoint, 1966).

Les agents chélateurs (diéthyldithiocarbamate, éthylxanthate de potassium, acide éthylène diamine tétracétique, acide citrique...) ont une action inhibitrice très marquée du fait de la mobilisation des ions cuivre nécessaires au fonctionnement des enzymes considérées.

La polyvinylpyrrolidone et la *N-vinyl-2 pyrrolidone* inhibent les phénoloxydases en adsorbant vraisemblablement les substrats ou les quinones formées (Harel *et al.*, 1966 ; Pierpoint, 1966).

L'ATP (adénosine triphosphate) diminue la formation de la couleur brune chez divers fruits, dont la pêche ; le mécanisme de cette action reste inconnu, mais l'on sait cependant que ce composé n'agit pas sur les phénoloxydases (Makower et Schwimmer, 1957).

L'activité phénoloxydasique de la pêche peut être réduite par des inhibiteurs compétitifs tels que le phloroglucinol (Reyes et Luh, 1960; Wong *et al.*, 1971 *a*) et le 2,3-naphtalène diol (Mayer *et al.*, 1964).

6. *Contrôle au verger de l'aptitude au brunissement des pêches.*

Récemment Buchanan *et al.* (1969) ont montré qu'on pouvait réduire l'aptitude au brunissement des pêches *Early Amber* et *Flordasun*, en appliquant des traitements d'éthrel, acide 2-chloroéthylphosphonique (30 et 50 p.p.m., lorsque le noyau a 12 mm de diamètre) et d'acide gibérellique (50 p.p.m., 2 semaines après la chute des pétales). Les résultats obtenus avec l'alar, acide N-diméthylaminosuccinamique (2 000 p.p.m.) ne sont pas aussi spectaculaires. Des tranches ou des purées de fruits cueillis sur des arbres traités à l'éthrel et à l'acide gibérellique ne brunissent pas alors que le témoin est très brun, 24 heures par exemple après le prélèvement.

L'action de ces produits n'est sans doute pas directe car le brunissement n'est pas réduit par trempage.

Ces auteurs ont pu préciser par la suite que l'activité des phénoloxydases dans les fruits traités était diminuée de 90 p. 100. Les teneurs en inhibiteurs, en substrats et en acide ascorbique sont identiques dans les deux cas (KNAPP *et al.*, 1970). Le mode d'action de ces composés sur les phénoloxydases est inconnu.

III. — CONCLUSION

Dans cette mise au point consacrée aux relations entre les enzymes et la qualité des pêches, ont été essentiellement rapportés des travaux sur les pectinases et les phénoloxydases.

Il est bien évident que l'étude des enzymes intervenant dans les arômes, domaine pratiquement inexploré jusque-là, serait du plus grand intérêt.

La décoloration des pêches de conserve à l'aide d'enzymes issues de microorganismes a fait l'objet d'études au Japon. Cette voie mériterait aussi d'être abordée.

Qu'il s'agisse de fruits mûrs destinés à la congélation ou à la confiturerie, à la production de jus et de nectars, qu'il s'agisse de fruits immatures destinés à la conservation ou au transport, les enzymes étudiées doivent être prises en considération.

Le fonctionnement des pectinases doit être contrôlé (stimulé ou inhibé) en vue de l'obtention d'une texture adéquate. A cet effet, la mise en œuvre de températures variables a déjà donné des résultats pratiques en Israël, qui seraient à confirmer dans notre pays.

L'action des phénoloxydases dans les pêches doit toujours être empêchée. Dans l'industrie, l'emploi d'inhibiteurs est largement pratiqué. Au verger, l'emploi de variétés sélectionnées reste la voie la plus sûre ; toutefois, les résultats relatifs à l'effet des régulateurs de croissance sur le contrôle des phénoloxydases permet d'envisager un nouveau moyen d'action.

Il apparaît ainsi que des applications industrielles pourraient découler de connaissances plus complètes sur les enzymes des pêches.

Reçu pour publication en mai 1972.

REMERCIEMENTS

Il nous est agréable de remercier M. R. CORDONNIER, I. N. R. A., Montpellier, qui a bien voulu lire ces pages et nous faire part de ses suggestions.

SUMMARY

ENZYMES AND QUALITY OF PEACHES

The enzymes involved in the quality of peaches are reviewed and means of control considered.

Pectolytic enzymes (PME and PG) play an important role in softening and appearance of the wooly breakdown. It is possible to delay the latter with special preserving techniques.

The enzymes involved in browning (phenoloxydases and peroxydases) have been particularly well studied in peaches, from the theorical and applied point of view. The factors likely to reduce browning are considered : they concern producers and processing industrialists.

RESUMEN

LAS ENZIMAS Y LA CALIDAD DE LOS MELOCOTONES

Se examinan en este artículo las enzimas que intervienen en la calidad de los melocotones, así como los medios de control tenidos en cuenta.

Las enzimas pectolíticas (PME y PG) desempenan un papel importante en el reblandecimiento y en la aparición de la textura algodonosa. Existe la posibilidad de retrasar la aparición de esta ultima por aplicación de técnicas particulares de conservación.

Las enzimas que intervienen en el ennegrecimiento (fenoloxidasas y peroxidasas) han sido estudiadas en particular en el caso del melocotón, desde los puntos de vista teórico y applicado. Los factores susceptibles de reducir el ennegrecimiento son considerados debidamente, ya que los mismos son interessantes para los productores y para los industriales de la transformación.

RIASSUNTO

GLI ENZIMI E LA QUALITA'DELLE PESCHE

Sono esaminati gli enzimi che intervengono nella qualità delle pesche prevedendone i mezzi di controllo.

Gli enzimi pectolitici (PME e PG) hanno un ruolo importante nell' ammollimento e nell' apparizione della tessitura lanuginosa. E' possibile ritardare l'apparizione di quest'utima mediante particulari tecniche di conservazione.

Sono stati particularmente studiati per la pesca, sul piano teorico e pratico, gli enzimi che intervengono nell'annerimento (fenolossidasi e perossidasi). Vengono esaminati i fattori che possono ridurre l'annerimento. Essi interessano i produttori e gli industriali nel campo della trasformazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams J. B., Blundstone H. A. W., 1971. Canned fruits other than Citrus. In : *The Biochemistry of fruits and their products*, vol. 2, 511, Academic Press, New York.

Aoki S., Araki C., Kaneko K., Katayama O., 1971. Occurrence of L-phenylalanine ammonia-lyase activity in peach fruit during growth. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 784-787.

Aylward F., Haisman D. R., 1969. Oxidation systems in fruits and vegetables. Their relation to the quality of preserved products. *Adv. Food Res.*, **17**, 1-76.

Barmann T. E., 1969. *Enzyme handbook*. Springer Verlag, Berlin.

Ben Arie R., Lavee S., Guelfat-Reich S., 1970. Control of woolly break-down of *Elberta* peaches in cold storage, by intermittent exposure to room temperature. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **95**, 801-803.

Ben Arie R., Lavee S., 1971. Pectic changes occuring in *Elberta* peaches suffering from woolly break-down. *Phytochemistry*, **10**, 531-538.

Boyes W. W., 1955. The development of woolliness in South African peaches during cold storage. *IXe Cong. Int. Froid*, Paris, **4**, 533-537.

Braverman J. B. S., 1963. *Introduction to the biochemistry of foods*, 294, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Buchanan D. W., Hall C. B., Biggs R. H., Knapp F. W., 1969. Influence of alar, ethrel and gibberellic acid on browning of peaches. *HortScience*, **4**, 302-303.

Constantinides S. M., Bedford C. L., 1967. Multiple forms of phenoloxidase. *J. Food Sci.*, **32**, 446-450.

Cordonnier R., 1971. De quelques effets en vinification des enzymes du raisin. *Revue Française d'Œnologie*, **41**, 5-19.

Craft C. C., 1961. Polyphenolic compounds in *Elberta* peaches during storage and ripening. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **78**, 119-131.

Czaninski Y., Catesson A. M., 1969. Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. *J. Microscopie*, **8**, 875-888.

Davies R., Boyes W. W., De Villiers D. J. R., 1938. Delayed storage of peregrine peaches. *Low Temp. Res. Lab. Capetown, Ann. Rept.*, 1937-38, 51-53.

Doesburg J. J., 1957. Relation between the solubilization of pectin and the fate of organic acids during maturation of apples. *J. Sci. Food Agric.*, **8**, 206-216.

Embs R. J., Markakis P., 1965. The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenoloxidase. *J. Food Sci.*, **30**, 753-758.

Fisher D. V., Britton J. E., O'Reilly H. S., 1943. Peach harvesting and storage investigations. *Sci. Agr.*, **24**, 1-16.

Guadagni D. G., Sorber D. G., Wilbur J. S., 1949. Enzymatic oxidation of phenolic compounds in frozen peaches. *Food Technol.*, **3**, 359-364.

Guelfat-Reich S., Ben Arie R., 1966. Effect of delayed storage and the stage of maturity at harvest on the keeping quality of peaches in Israel. *Israel J. Agr. Res.*, **16**, 163-170.

Haan (De) I., 1957. Pectin conversions in peaches during cold storage. *S. African Ind. Chem.*, **11**, 26.

Harel E., Mayer A. M., 1968. Interconversion of sub units of catechol oxidase from apple chloroplast. *Phytochemistry*, **7**, 199-204.

Harel E., Mayer A. M., 1970. The use of a fungal pectate lyase in the purification of laccase from peaches. *Phytochemistry*, **9**, 2447-2452.

Harel E., Mayer A. M., Shain Y., 1966. Catechol oxidases, endogenous substrates and browning in developing apples. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 389-392.

Knapp F. W., Hall C. B., Buchanan D. W., Biggs R. H., 1970. Reduction of polyphenoloxidase activity in peaches sprayed with alar, ethrel or gibberelic acid. *Phytochemistry*, **9**, 1453-1456.

Koller A., 1966. In : *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 1, 74, Academic Press, New York.

Macheix J.-J., 1970. Rôle de divers facteurs intervenant dans le brunissement enzymatique des pommes pendant la croissance. *Physiol. vég.*, **8**, 585-602.

Makower R. V., Schwimmer S., 1957. Enzymatic browning, reflectance measurements, and effect of adenosine triphosphate on colour changes induced in plant slices by polyphenoloxidase. *J. Agr. Food Chem.*, **5**, 768.

Marteau G., 1967. Les enzymes pectolytiques et la technologie du raisin et de la pomme. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, 223-245.

Mayer A. M., Harel E., Shain Y., 1964. 2,3-naphtalenediol, a specific competitive inhibitor of phenolase. *Phytochemistry*, **3**, 447-451.

Mc Cready R. M., Mc Comb E. A., 1954. Pectic constituents in ripe and unripe fruit. *J. Food Sci.*, **19**, 530-535.

Nelson R. F., Finkle B. J., 1964. Enzyme reactions with phenolic compounds : effects of *o*-methyltransferase and high pH on the polyphenoloxidase substrate in apple. *Phytochemistry*, **3**, 321-325.

Pech J.-C., Bardet C., Fallot J., 1970 *a*. Extraction et séparation par électrophorèse des protéines solubles de la poire *Passe-Crassane*. *C. R. Acad. Sci.*, **270**, 1171-1173.

Pech J.-C., Bardet C., Fallot J., 1970 *b*. Séparation des protéines solubles de divers fruits. Mise en évidence d'enzymes à activité amylolytique. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 311-321.

Pech J.-C., Fallot J., Carles J., 1970 *c*. La proline au cours de la conservation de la poire *Passe-Crassane*. *C. R. Acad. Sci.*, **271**, 1292-1295.

Pierpoint W. S., 1966. The enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.*, **98**, 567-580.

Ponting J. D., 1960. The control of enzymatic browning of fruits. In : *Food enzymes*, 105-124. The AVI Publishing Company, Westport, Connecticut.

Pressey R., Hinton D. M., Avants J. K., 1971. Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *J. Food Sci.*, **36**, 1070-1073.

Reyes P., Luh B. S., 1960. Characteristics of browning enzymes in fay *Elberta* freestone peaches. *Food Technol.*, **14**, 570-575.

Romani R. J., Jennings W. G., 1971. Stone fruits. In : *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 2, 411-436, Academic Press, New York.

Schwerdtfeger E., 1971. Freie Aminosaüren und Enzymaktivitäten in ihrer Beziehung zur Qualität von Nahrungspflanzen. *Qual. Plant. Mater. Veg.*, **20**, 183-201.

Shewfelt, A. L. 1965. Changes and variations in the pectic constitution of ripening peaches as related to product firmness. *J. Food Sci.*, **30**, 573-576.

Souty M., Perret A., André P., 1967. Premières observations sur quelques variétés de pêches destinées à la conserve. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 55-68.

Ulrich R., Hartmann C., 1967. Enzymes et maturation des fruits. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, 161-193.

Ulrich R., Thaler O., 1955. Sur la présence et les variations de quelques constituants des poires au cours de leur développement (xylose, acide quinique, proline). *C. R. Acad. Sci*, **240**, 1625-1626.

WANKIER B. N., SALUNKHE D. K., CAMPBELL W. F., 1970. Effects of controlled atmosphere storage on biochemical changes in apricot and peach fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **95**, 604-609.

WEURMAN C., SWAIN T., 1953. Chlorogenic acid and the enzymatic browning of apples and pears. *Nature*, **172**, 678.

WONG T. C., LUH B. S., WHITAKER J. R., 1971 *a*. Isolation and characterization of polyphenoloxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiol*, **48**, 19-23.

WONG T. C., LUH B. S., WHITAKER J. R., 1971 *b*. Effect of phloroglucinol and resorcinol on the clingstone peach polyphenoloxidase-catalyzed oxidation of 4-methylcatechol. *Plant Physiol.*, **48**, 24-30.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *Résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. On demande deux exemplaires.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à cette même adresse.

Technologie agricole.

Le directeur de la publication: M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 11-1972.

Dépôt légal: 4e trimestre 1972. N° d'impression: 1395.

annales de technologie agricole

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE
04 MAI 1973
DOCUMENTATION
VERSAILLES

Trimestriel

1972

Vol. 21 . N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (2), 99-122.

ASPECT MICROBIOLOGIQUE DE LA CONSERVATION DU MAÏS-GRAIN HUMIDE PAR L'ACIDE PROPIONIQUE

Jeanne POISSON et B. CAHAGNIER

Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés,
Section Microbiologie, I. N. R. A.,
16, rue Nicolas-Fortin
75013 Paris

RÉSUMÉ

Des lots de maïs fraîchement récoltés, de teneurs en eau égales à 35 et 21 p. 100, sont traités avec des doses d'acide propionique s'échelonnant de 0,3 à 1,5 p. 100, puis stockés pendant dix-sept mois à 5°C, 13°C et 22°C en atmosphère légèrement confinée et renouvelée.

L'effet dépressif du traitement sur la microflore des grains varie avec la dose d'acide et la teneur en eau des grains. Les moisissures « du champ » et les bactéries Gram-négatif sont les éléments de la microflore des grains les plus sensibles au traitement.

Au cours du stockage, plusieurs flores bactériennes peuvent se succéder sur les grains (*Lactobacillus*, *Pseudomonas*, bactéries sporulantes) à un rythme d'autant plus lent que la dose est plus élevée. Parmi les moisissures, ce sont surtout des *Penicillium* qui, à la longue, s'implantent sur les grains traités, quand la protection due à l'acide propionique diminue.

Les courbes isochrones de conservation établies à partir des résultats obtenus permettent d'apprécier la durée probable de conservation d'un lot traité en fonction des caractéristiques du stockage et de la dose d'acide utilisée. De nombreux facteurs influent sur la durée de protection du traitement : l'affaiblissement de la dose, l'élévation de la température, de la teneur en eau et de l'aération, l'état de division des grains et la nature de la microflore implantée au début du stockage.

Mots clés : *maïs, stockage, conservation, humidité, acide propionique, microbiologie.*

INTRODUCTION

Une conservation satisfaisante des céréales récoltées très humides, mais néanmoins destinées à l'alimentation humaine ou animale, ne peut être assurée qu'en les soustrayant à l'action des agents de dégradation par des procédés qui ne provoquent ni formation ni dépôt de produits toxiques dans le grain. Dans ce but, on fait surtout appel aux techniques de séchage ; celles de stockage à basse tempé-

rature ou sous atmosphère modifiée sont plus rarement utilisées. Mais, dans le premier cas, il n'est pas toujours possible de sécher les grains au rythme de leur récolte, et dans le second cas les procédés utilisés sont onéreux, souvent d'une efficacité insuffisante, et ne dispensent pas d'une opération de séchage au moment de l'ouverture des silos.

En France, c'est surtout le maïs-grain humide qui pose un difficile problème de conservation ; du fait de l'extension de sa culture vers les régions septentrionales et de l'utilisation de variétés tardives à haut rendement, il est récolté à des teneurs en eau très élevées qui varient de 30 à 40 p. 100 et sa production augmente chaque année ; elle est passée de 800 000 tonnes en 1953 à 7 580 000 tonnes en 1970, de telle sorte que la capacité des séchoirs, malgré un gros effort d'équipement, est insuffisante.

Pour tenter de pallier de tels inconvénients, un nouveau procédé de stabilisation des grains humides de céréales fourragères par traitement avec de l'acide propionique a été expérimenté avec succès, au cours de ces dernières années, en Grande-Bretagne, en Allemagne, dans les Pays nordiques et au Canada, pour l'orge, le seigle, le blé et l'avoine, puis pour le maïs (Burrell *et al.*, 1969 ; Bosset, 1970).

Ce procédé présente l'avantage d'être d'une application simple et de ne nécessiter qu'un équipement peu coûteux (Parneix, Combe et Février, 1971). Mais le grand intérêt de l'acide propionique réside surtout dans le fait qu'il est facilement métabolisable par les organismes à sang chaud et que, par conséquent, les grains traités sont utilisables pour l'alimentation animale.

L'éventuelle toxicité de l'acide propionique et de ses sels, due à une ingestion répétée, a été étudiée sur le rat, le lapin et l'homme adulte ; les essais à court terme et à long terme sur le rat et le lapin se sont révélés satisfaisants (Harshbarger, 1942 ; Graham, Teed et Grice, 1954). Pour l'homme adulte, la dose acceptable sans aucun risque pour une absorption très prolongée est de l'ordre de un gramme d'acide propionique par jour (O. M. S., 1962). Mais l'acide propionique provoque sur la peau et les muqueuses de fortes réactions inflammatoires et des dégénérescences superficielles des tissus ; ainsi, une solution aqueuse à 20 p. 100 d'acide propionique cause une sévère inflammation de la conjonctive du lapin et un trouble laiteux irréversible de la cornée. Lors des manipulations de l'acide propionique, les utilisateurs doivent donc éviter tout contact avec cet acide et se protéger des brouillards de pulvérisation.

L'addition d'acide propionique aux grains de maïs réduit la perte de matière sèche pendant le stockage et diminue fortement l'activité amylolytique (Delié *et al.*, 1970) ; de même, Dumay *et al.* (1972) constatent que le traitement améliore la qualité des grains de maïs entiers ensilés en épargnant les glucides et en limitant la dégradation des fractions protéiques les plus riches en acides aminés essentiels.

Au cours de ces dernières années, de nombreux essais ont été poursuivis sur bovins, ovins et porcins et sur volaille pour tester la qualité nutritionnelle des grains traités par l'acide propionique. Les résultats obtenus semblent satisfaisants dans leur ensemble. Le traitement ne diminue pas l'appétibilité des grains traités. Les taux d'utilisation et de croissance sont en général aussi bons qu'avec les grains non traités et aucun trouble physiologique n'apparaît. On note même un meilleur état sanitaire des porcs nourris avec du maïs traité (Bronsch, 1970 ; Jones *et al.*, 1970 ; Young *et al.*, 1970 ; A. G. P. M., 1970-1971 ; Février *et al.*, 1971 ; Gaye *et al.*, 1971 ; Geay et Lienard, 1971).

Depuis 1970, l'utilisation de l'acide propionique est autorisée en France, unique-

ment pour la conservation des céréales destinées à l'alimentation animale, à la dose maximale de 3 p. 100. Actuellement l'acide propionique est commercialisé sous différentes appellations homologuées à la fin de 1971.

Les propriétés antimicrobiennes de l'acide propionique et d'autres acides gras saturés à chaîne droite sont connues depuis 1913 (KIESEL).

Les recherches effectuées sur l'action bactéricide et bactériostatique de l'acide propionique et de ses sels de sodium et de calcium ont fait l'objet d'une étude bibliographique exhaustive de SINGH-VERMA (1970). WRIGHT et SKEGGS (1946) ont examiné le pouvoir inhibiteur du propionate de sodium sur la croissance d'*Escherichia coli*. HESELTINE (1952) a étudié de façon systématique l'action du propionate de sodium sur la croissance de micro-organismes pathogènes. Il s'est avéré que les bactéries Gram-négatif sont plus sensibles que les bactéries Gram-positif, à l'exception toutefois de *Proteus vulgaris* et d'*Escherichia coli*.

Les effets fongicides et fongistatiques de l'acide propionique et de ses sels ont été mis en évidence par un grand nombre de chercheurs, tels que HOFFMANN, SCHWEITZER et DALBY (1936, 1939, 1940, 1941) qui ont trouvé par ailleurs que l'action antifongique des acides gras saturés est d'autant plus marquée que la chaîne est plus longue.

C'est sous sa forme non dissociée que l'acide propionique est le plus actif vis-à-vis des micro-organismes. Pour INGRAM (1956) son pouvoir inhibiteur est d'autant plus grand que le pH du substrat est plus bas.

Le mécanisme de l'inhibition ne paraît pas encore nettement élucidé. HILL (1952) et KAMIHARA (1968) ont mis en évidence, dans le cas de *Streptococcus faecalis*, un blocage de la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-coenzyme A. Mais certains germes de moisissures sont capables d'assimiler l'acide propionique, tels les *Aspergillus glaucus* (RICHARDS et LLYOD, 1966).

Le traitement des grains n'entraîne pas toujours une disparition complète et durable de leurs populations microbiennes ; néanmoins, jusqu'à ce jour, il n'existe que peu d'études relatives à l'évolution microbiologique des grains traités. Les unes, très fragmentaires, sont relatives à des lots de plusieurs dizaines de quintaux de maïs (A. G. P. M., 1970, 1971 ; BURRELL *et al.*, 1971) ; les autres concernent surtout des essais poursuivis à l'échelle du laboratoire avec de l'orge, de l'avoine, du blé, du seigle et du maïs.

HUITSON (1968) démontre qu'il existe une relation linéaire entre la teneur en eau de l'orge et la concentration d'acide propionique à utiliser, mais SPICHER (1970), en étudiant la conservation des céréales panifiables, obtient d'aussi bons résultats avec des doses d'acide propionique plus faibles. SINGH-VERMA (1970), comme HUITSON (1968), trouve une relation linéaire entre la teneur en eau du grain et la dose d'acide propionique à utiliser, en effectuant des recherches avec du blé, de l'orge, de l'avoine, du maïs et des aliments pour le bétail. D'après ces travaux, une dose d'acide propionique de 1,2 p. 100 préserve le maïs humide (teneur en eau 35 p. 100) de toute invasion microbienne pendant trois mois au moins. Enfin, il constate que plus tôt est effectué le traitement après la récolte, plus celui-ci est efficace contre le développement des moisissures et des levures dans les grains ; par contre, en ce qui concerne les bactéries, il lui semble préférable de traiter après quelques jours de stockage (SINGH-VERMA, 1971).

FINK (1970), se basant sur l'élévation de température, a établi des diagrammes

isohydres de conservation. Les doses préconisées par FINK (1970) et SINGH-VERMA (1970) sont inférieures à celles indiquées par HUITSON (1968). Enfin, certains chercheurs ont étudié la diffusion de l'acide dans les lots de grains en rapport avec la durée de protection assurée par le traitement (BURRELL *et al.*, 1971 ; HYDE et BURRELL, 1971).

La comparaison des différents résultats obtenus jusqu'alors est assez difficile, car les conditions précises dans lesquelles ont été effectués les essais, température et aération par exemple, sont parfois insuffisamment définies, ainsi que les critères retenus pour évaluer la durée de conservation.

Les travaux que nous avons effectués ont surtout eu pour but d'apporter des précisions sur l'évolution de la microflore du maïs humide traité par l'acide propionique pour une durée de stockage supérieure à un an.

MATÉRIEL. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL. MÉTHODES D'ANALYSE

1. — *Matériel*

Le maïs utilisé, variété hybride *I. N. R. A. 258*, provient de la région de Senlis où il est récolté très humide. Il est mis en expérience soit aussitôt après la moisson, sa teneur en eau étant alors de 35 p. 100, soit après séchage jusqu'à une teneur en eau de 21 p. 100.

2. — *Protocole expérimental*

Les lots de maïs sont homogénéisés pendant 30 minutes dans un mélangeur cubique tournant autour d'une de ses diagonales à raison de 64 tours/minute. Toutes les précautions sont prises pour éviter une contamination secondaire des grains qui modifierait la composition de sa microflore.

Chaque lot est divisé en 6 parties. Exception faite pour la fraction témoin, l'acide propionique est pulvérisé sur les grains, à raison de 0,3-0,5-0,75-1 et 1,5 p. 100 de la masse de maïs humide. Après traitement, les différentes fractions sont à nouveau homogénéisées séparément dans un mélangeur cubique pendant 30 minutes.

Pour les essais de stockage des grains effectués en atmosphère renouvelée, les lots de maïs témoins et traités avec 1 p. 100 d'acide sont versés dans des cellules cylindriques en leucoflex contenant 2,5 kg de grains. Ces cellules sont balayées par de l'air (vitesse de renouvellement 1 cm/s) à 13°C saturé de vapeur d'eau et décontaminé par passage à travers un filtre en bronze poreux suivant le procédé mis au point par SAINT-LEBE *et al.* (1966).

Pour les essais effectués en atmosphère semi-confinée, 2,5 kg de grains sont répartis dans des sachets en mailles de nylon qui sont suspendus dans des enceintes d'une capacité de 10 litres, fermées de façon non étanche et réglées à 5°C, 13°C et 22°C. Le volume des grains représente 1/5 du volume des enceintes. L'humidité de l'atmosphère semi-confinée des enceintes est maintenue constante par mise en équilibre avec une solution aqueuse saturée de chlorure de baryum ou avec de l'eau distillée qui réalisent des humidités relatives voisines de 88 et de 100 p. 100, les teneurs en eau correspondantes des grains de maïs étant respectivement de 21 et de 35 p. 100 de la substance humide (s.h.).

3. — *Méthodes d'analyse*

3. 1. *Détermination de la teneur en eau des grains.*

Le dosage s'effectue sur des grains de maïs tels quels par un séchage à l'étuve à 130°C de 10 g de grains, pendant 38 à 40 heures (GUILBOT, 1969). Les résultats sont exprimés en p. 100 de la substance humide (s.h.).

3 2. *Méthode de dénombrement et d'analyse floristique.*

En l'absence de méthode de référence, et en raison de la répartition très hétérogène des micro-organismes sur les grains de maïs et de la présence toujours possible d'une microflore

interne, il a été nécessaire d'adapter la méthode classique de dénombrement par dilutions-ensemencements au cas particulier du maïs.

L'originalité de la méthode mise au point réside dans l'importance de la prise d'essai des grains et dans le mode de dispersion des micro-organismes dans un broyeur mélangeur.

3. 21. *Description de la méthode mise au point.*

Environ 150 g de grains sont prélevés, pesés exactement et versés aseptiquement dans un bol « mixer Waring Blendor » en acier inoxydable d'un litre, contenant 400 ml de diluant stérile (chlorure de sodium 9 g, bacto-peptone Difco 1 g, tween 80 0,033 g, eau distillée sur verre q.s.p. 1 000 ml, pH 7).

Après 20 minutes de trempage pour revivifier les micro-organismes, les grains sont broyés pendant 1,5 minute à la vitesse de 12 500 tours/minute. La température de la suspension ne s'élève pas de plus de 3°C pendant le broyage.

Le broyat obtenu est dilué une première fois au 1/5. La nouvelle suspension est homogénéisée pendant 10 minutes, par un agitateur secoueur Prolabo, à raison de 250 secousses/minute, puis analysée par la méthode classique des dilutions-ensemencements. Dans ces conditions, la proportion dans le milieu de culture de l'acide propionique entraîné est au maximum de 0,033 p. 100. Nous avons vérifié que cette dose ne modifie pas les résultats des dénombrements de la microflore du maïs.

Les milieux de culture utilisés pour révéler au mieux les différentes compositions floristiques des grains de maïs figurent parmi ceux qui sont employés en bactériologie alimentaire (Buttiaux, 1968), en microbiologie des sols (Pochon, 1958) et en microbiologie générale (Cassagne, 1961).

Les résultats quantitatifs indiquent le nombre total des micro-organismes considérés par gramme de grains. Dans le cas des moisissures, l'estimation maximale de la population est effectuée par dénombrement de chaque genre sur le milieu où il compte le plus de colonies et addition des différents résultats partiels.

Les coefficients de variation qui affectent la reproductibilité de cette méthode sont de 15 dans le cas des bactéries, de 15,7 dans celui des levures et de 12,7 dans celui des moisissures, valeurs assez faibles pour une méthode microbiologique.

3. 22. *Justification du mode opératoire.*

Le modèle de broyeur utilisé, en acier inoxydable, a été choisi en raison de sa conception qui permet de travailler aseptiquement sur un poids de grain assez important avec de faibles risques de contamination. En effet, couteaux et bol sont solidaires et le couvercle coiffe les bols sans joints ; la stérilisation des trois parties n'exige qu'une seule opération.

Un broyage d'une durée de 1,5 minute libère plus de micro-organismes que les broyages plus longs (2 et 2,5 minutes) ou plus courts (0,5 et 1 minute).

Le nombre de micro-organismes libérés par gramme de produit est plus élevé en partant de 150 g que de prises d'essai de 50, 100 ou 200 g.

Le formule du diluant a été retenue après comparaison des résultats obtenus avec deux autres diluants figurant parmi les plus employés mais ne renfermant pas de tween 80 (Horter et Klein, 1969).

RÉSULTATS OBTENUS

1. — *Action extemporanée du traitement sur les éléments dominants de la population microbienne des grains*

1. 1. *Action dépressive.*

Au moment du traitement, la population bactérienne des grains diminue dans des proportions d'autant plus importantes que la dose d'acide propionique est plus élevée (fig. 1). Ainsi, de 18 millions de bactéries par gramme de grain, elle tombe à 1 400 après addition de 0,3 p. 100 d'acide propionique et à 55 après addition de 1 p. 100.

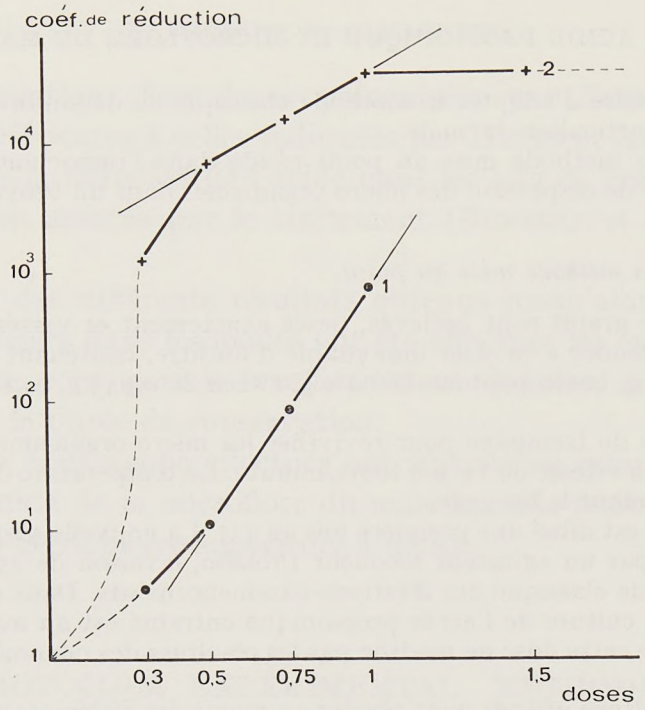


FIG. 1. — *Coefficient de réduction des bactéries présentes sur les grains de maïs ayant des teneurs en eau de 21 p. 100 s. h.* (courbe 1) *et de 35 p. 100 s. h.* (courbe 2) *en fonction de la dose d'acide propionique*

abscisse : dose d'acide propionique
ordonnée : coefficient de réduction

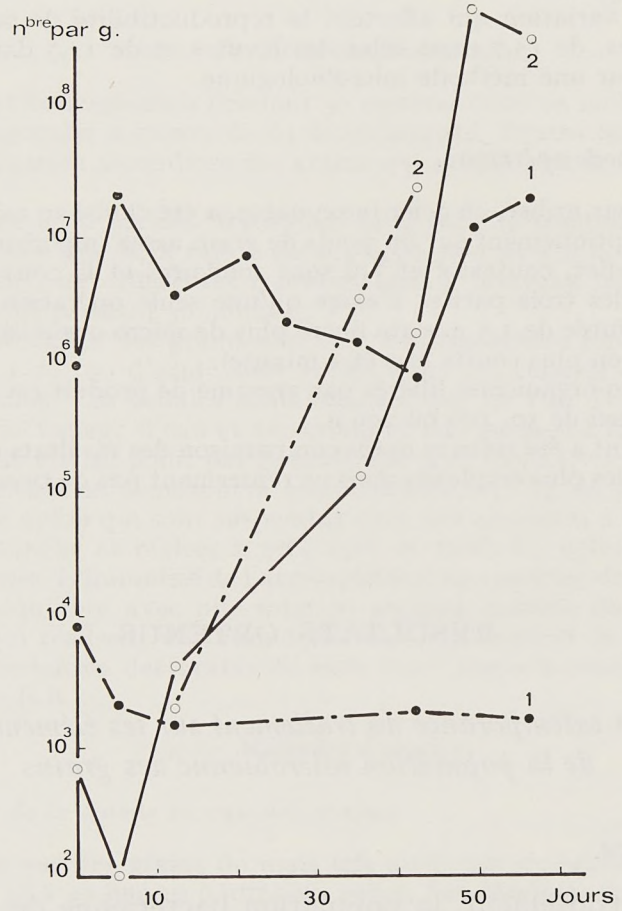


FIG. 2. — *Influence de l'acide propionique sur la population bactérienne des grains au cours d'un stockage à 13°C en atmosphère ventilée*

1 — maïs témoin HR : 100 p. 100 ; 2 : maïs traité avec 1 p. 100 d'acide
——— bactéries « ordinaires » (mésophiles aérobies et aérobies-anaérobies facultatives).
— - — lactobacilles.
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de bactéries par g de grains.

L'évolution du coefficient de réduction (1) du nombre de bactéries en fonction de la dose d'acide est vraisemblablement représentée par une courbe d'allure sigmoïde, mais, d'après les données expérimentales, entre 0,5 et 1 p. 100 la courbe peut

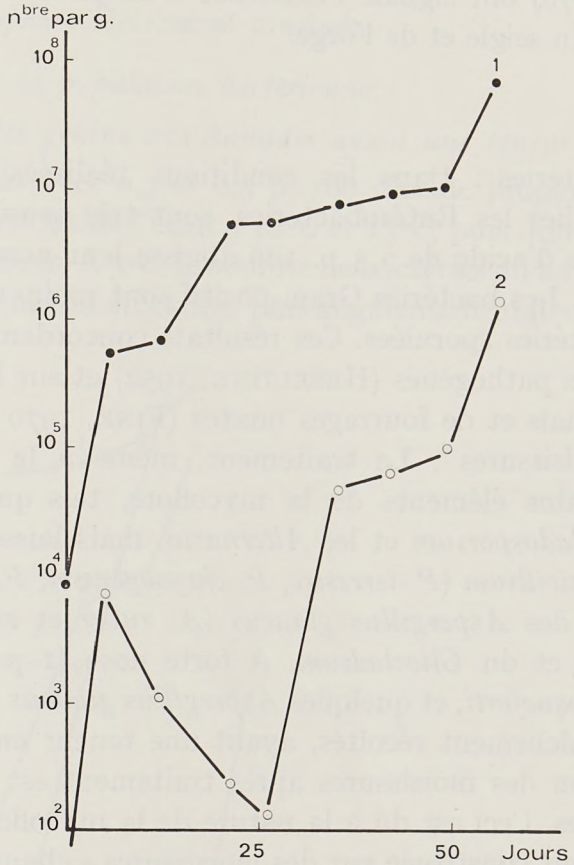


FIG. 3. — *Influence de l'acide propionique sur les moisissures des grains au cours d'un stockage à 13°C en atmosphère ventilée*

1 : maïs témoin ; 2 : maïs traité avec 1 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

être assimilée à une exponentielle, aussi bien dans les lots ayant une teneur en eau de 21 p. 100 que dans ceux qui ont une teneur en eau de 35 p. 100. Dans ce dernier cas, l'équation de la courbe d'évolution du coefficient de réduction est

$$y = 3\,500 \times 2^{\left(\frac{x}{0,25} - 1\right)}$$

quand la dose d'acide propionique x varie de 0,5 à 1 p. 100.

Le traitement du maïs par l'acide propionique détruit la presque totalité des spores de moisissures et les levures, même à la dose de 0,3 p. 100 ; aussi n'est-il pas possible d'établir dans ce cas la courbe du coefficient de destruction, la méthode de dénombrement n'étant pas assez sensible.

L'action dépressive du traitement sur la population microbienne des grains augmente avec leur teneur en eau. Ainsi, pour une dose de 0,5 p. 100, le coefficient de réduction des bactéries est de 11,5 dans le cas du grain ayant une teneur en eau

(1) Le coefficient de réduction est la valeur du rapport du nombre de micro-organismes revivifiables avant traitement au nombre de micro-organismes revivifiables après traitement.

de 21 p. 100 et de 6 920 dans celui du grain ayant une teneur en eau de 35 p. 100. Dans les mêmes conditions, les coefficients de réduction des moisissures sont de 270 et de plus de 18 000, et ceux des levures de 10,86 et de plus de 11 000. SINGH-VERMA (1970) et SPICHER (1970) ont signalé l'existence d'un phénomène identique en travaillant avec du blé, du seigle et de l'orge.

1. 2. *Action sélective.*

Vis-à-vis des bactéries : Dans les conditions réalisées, les bactéries Gram-négatif, et en particulier les Entérobactéries, sont très sensibles à l'acide propionique ; ainsi, une dose d'acide de 0,3 p. 100 abaisse leur nombre de 9 millions par gramme à moins de 2. Les bactéries Gram-positif sont moins affectées par le traitement, surtout les bactéries sporulées. Ces résultats concordent avec les observations faites sur des bactéries pathogènes (HESELTINE, 1952) et sur les populations du blé (SPICHER, 1970), du maïs et de fourrages mixtes (FINK, 1970 ; SINGH-VERMA, 1970).

Vis-à-vis des moisissures : Le traitement, même à la plus faible dose (0,3 p. 100), détruit certains éléments de la mycoflore, tels que les *Cephalosporium*, les *Verticillium*, les *Cladosporium* et les *Alternaria*, mais laisse subsister des *Mucor* (*M. hiemalis*), des *Penicillium* (*P. terrestre, P. chrysogenum, P. pulvillorum, P. claviforme, P. roqueforti*), des *Aspergillus glaucus* (*A. ruber* et surtout *A. repens*), du *Monoascus purpureus* et du *Gliocladium*. A forte dose (1 p. 100), seuls quelques *Penicillium*, dont *P. roqueforti*, et quelques *Aspergillus glaucus* persistent.

Sur les grains fraîchement récoltés, ayant une teneur en eau de 35 p. 100, le coefficient de réduction des moisissures après traitement est supérieur à celui des bactéries et des levures. Ceci est dû à la nature de la mycoflore des grains qui à ce stade est essentiellement constituée par des moisissures « champêtres » plus sensibles aux différents types d'agression que les moisissures de stockage.

2. — *Évolution, pendant le stockage, des populations microbiennes des grains traités*

2. 1. *Stockage en atmosphère renouvelée* [1].

2. 11. *Évolution de la population bactérienne.*

Le nombre de bactéries augmente rapidement dans le lot traité ; après un mois de stockage il a la même valeur que dans le lot témoin, puis celle-ci est largement dépassée (fig. 2).

Les bactéries coliformes ne réapparaissent pas. Les lactobacilles se multiplient abondamment dans le lot traité pendant le premier mois de stockage et disparaissent vers la fin du deuxième mois alors qu'ils ne se développent pas dans le lot témoin.

2. 12. *Évolution de la population fongique.*

Au cours des premiers jours de stockage, des *Mucor* se développent de façon explosive, puis régressent et font place à du *Penicillium* qui envahit très vite les grains.

[1] Travail effectué avec l'aide financière du C. E. A. et la collaboration du Service de Radioagronomie (Département de Biologie).

Néanmoins, après deux mois de stockage, le lot traité est moins contaminé que le témoin qui est colonisé par une mycoflore plus variée (fig. 3).

Les levures ne se développent pas dans les lots traités.

2. 2. Stockage en atmosphère légèrement confinée.

2. 21. Évolution de la population bactérienne.

2. 211. Dans les grains très humides ayant une teneur en eau de 35 p. 100.

Dans les lots traités avec 0,3 et 0,5 p. 100 d'acide propionique, le nombre de bactéries augmente au début de l'essai à 22°C et 13°C, puis diminue pour augmenter rapidement après deux mois. A 5°C, le nombre de bactéries du lot traité avec 0,3 p. 100 d'acide varie peu au début du stockage, puis augmente brutalement après deux mois.

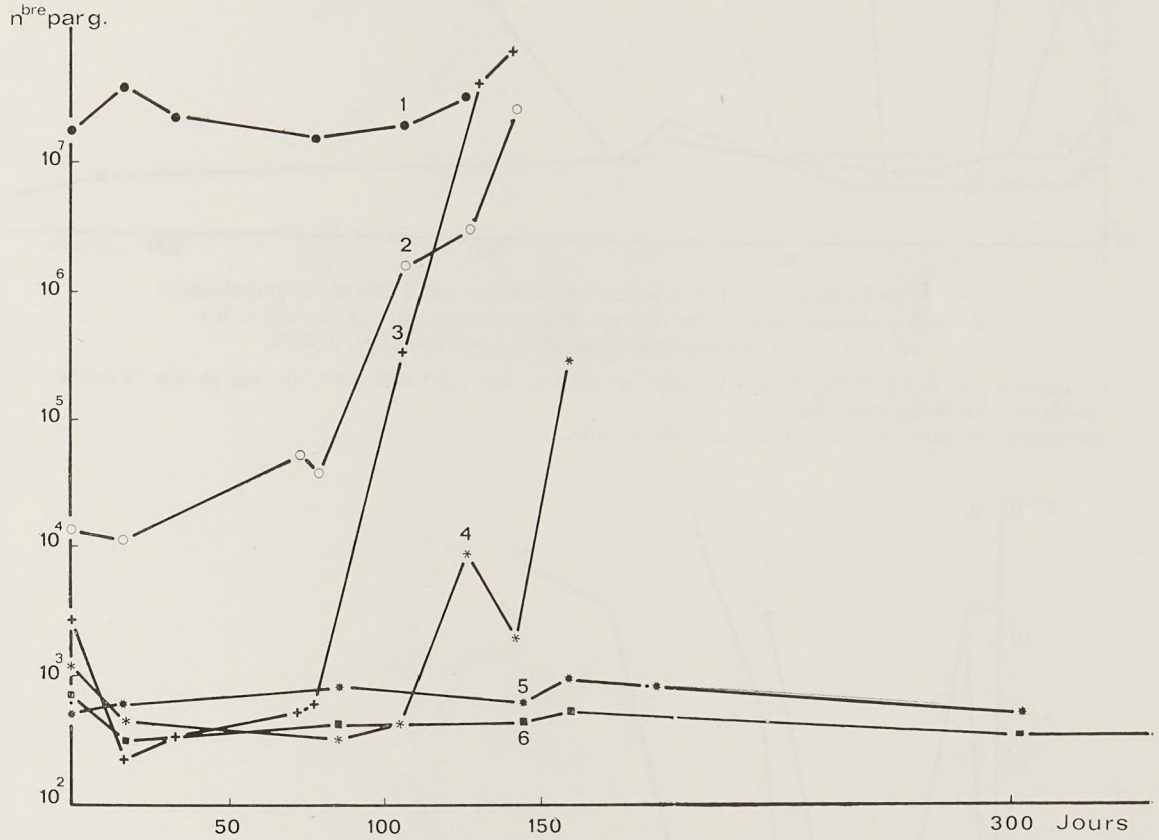


FIG. 4. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative de la population bactérienne des grains* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 5°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 ; 5 : 1 p. 100 ; 6 : 1,5 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de bactéries par g de grains

Dans tous les autres lots (traités avec 0,75-1-1,5 p. 100 d'acide et stockés à 22°C, 13°C et 5°C et dans le lot traité avec 0,5 p. 100 d'acide et stocké à 5°C), au contraire, le nombre de bactéries diminue au début du stockage. L'évolution de la population bactérienne se fait en trois phases : une phase de diminution, une phase stationnaire, une phase d'augmentation. Une séquence semblable des périodes de multiplication et de régression a été observée par SINGH-VERMA (1971) dans le cas de fourrages mixtes traités par l'acide propionique.

Les figures 4, 5 et 6 illustrent l'évolution du nombre de bactéries dans les lots stockés à 22°C, 13°C et 5°C. La durée de la phase stationnaire est d'autant plus

FIG. 5. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative de la population bactérienne des grains* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage en atmosphère semi-confinée, à 13°C*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 ; 5 : 1 p. 100 ; 6 : 1,5 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de bactéries par g de grains.

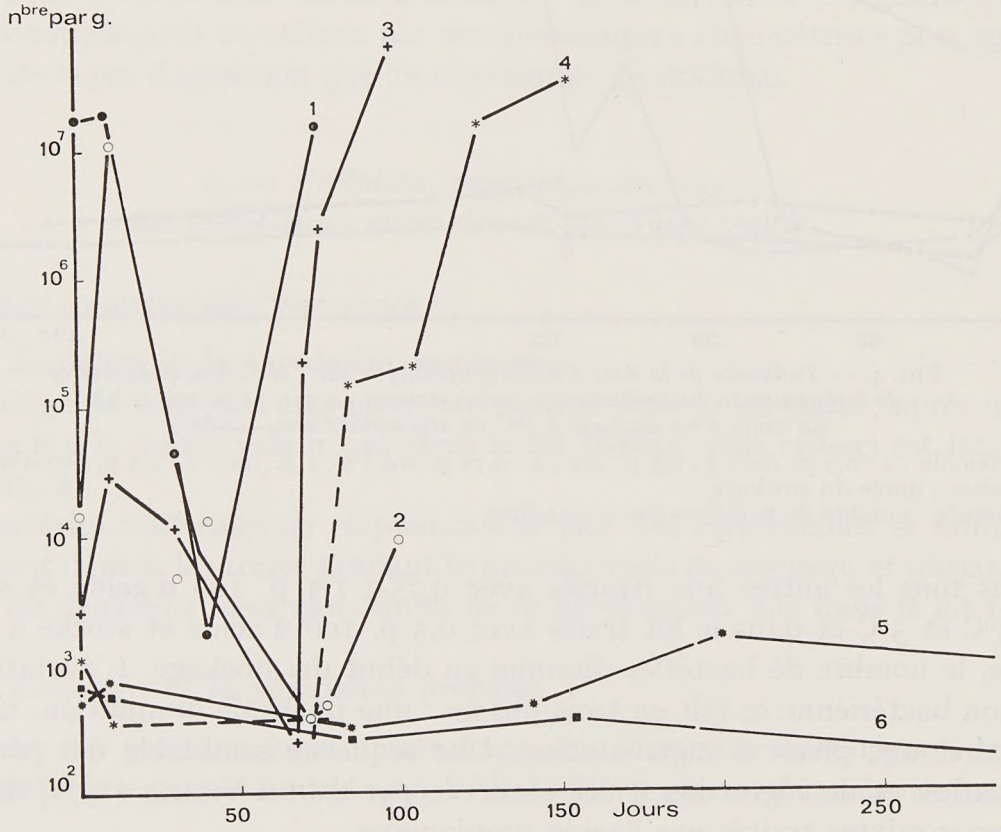


FIG. 6. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative de la population bactérienne des grains* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 22°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 ; 5 : 1 p. 100 ; 6 : 1,5 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de bactéries par g de grains

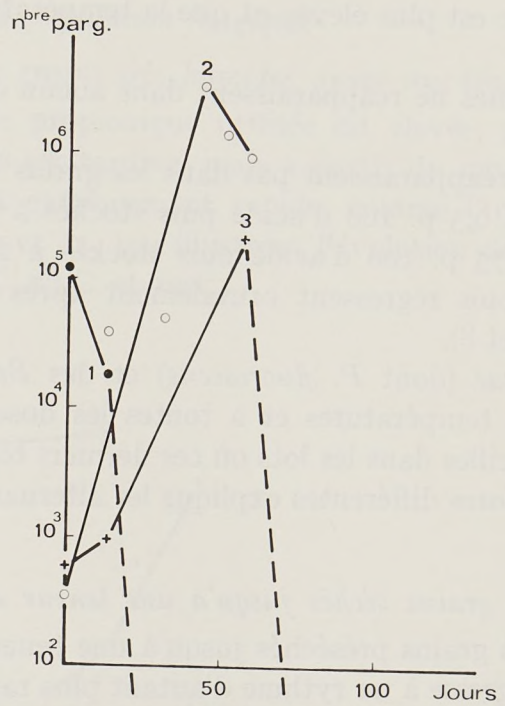


FIG. 7. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des lactobacilles des grains* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 13°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de bactéries par g de grains

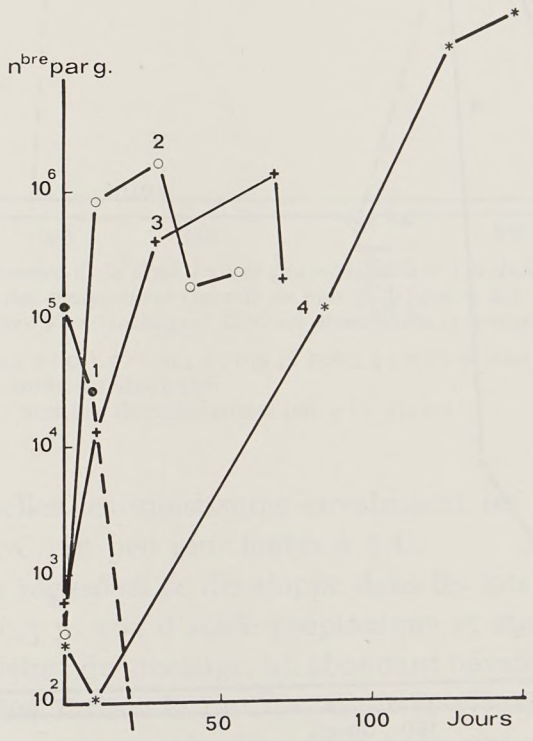


FIG. 8. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des lactobacilles des grains* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 22°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de bactéries par g de grains

longue que la dose d'acide est plus élevée et que la température de stockage est plus basse.

Les bactéries coliformes ne réapparaissent dans aucun des lots traités au cours du stockage.

Les lactobacilles ne réapparaissent pas dans les grains stockés à 5°C. Dans les grains traités avec 0,3 et 0,5 p. 100 d'acide puis stockés à 13°C et dans les grains traités avec 0,3-0,5 et 0,75 p. 100 d'acide puis stockés à 22°C, les lactobacilles se multiplient activement puis régressent brutalement après la phase exponentielle de développement (fig. 7 et 8).

Des *Pseudomonadaceae* (dont *P. fluorescens*) et des *Bacillaceae* (*B. cereus*) se développent à toutes les températures et à toutes les doses, excepté 1,5 p. 100 ; ils succèdent aux lactobacilles dans les lots où ces derniers ont pu se multiplier.

Cette succession de flores différentes explique les alternances de phases de croissance et de déclin.

2. 212. *Dans les grains séchés jusqu'à une teneur en eau de 21 p. 100.*

Dans tous les lots de grains préséchés jusqu'à une teneur en eau de 21 p. 100, le nombre de bactéries régresse à un rythme d'autant plus rapide que la dose d'acide propionique et la température de stockage sont plus élevées.

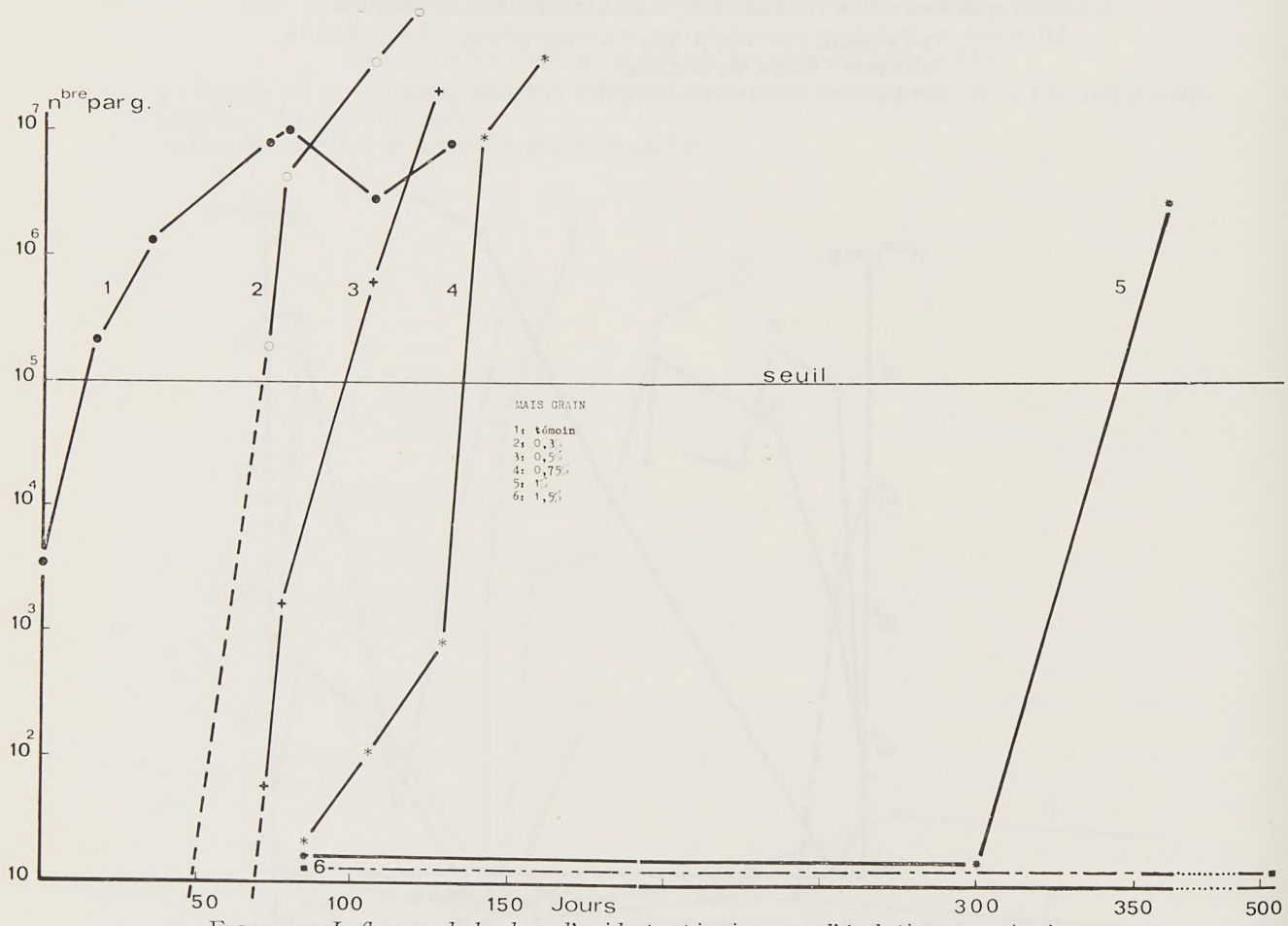


FIG. 9. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des moisissures des grains* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 5°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 ; 5 : 1 p. 100 ; 6 : 1,5 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

2. 22. *Évolution de la population fongique.*

2. 221. *Dans les grains très humides ayant une teneur en eau de 35 p. 100.*

Plus la dose d'acide propionique utilisée est élevée, plus la colonisation des grains par les moisissures est tardive, mais à partir du moment où elle commence à être décelable, elle est extrêmement rapide, comme l'indiquent les pentes des courbes des figures 9, 10 et 11, qui illustrent l'évolution du nombre de moisissures dans les lots stockés à 5°C, 13°C, et 22°C.

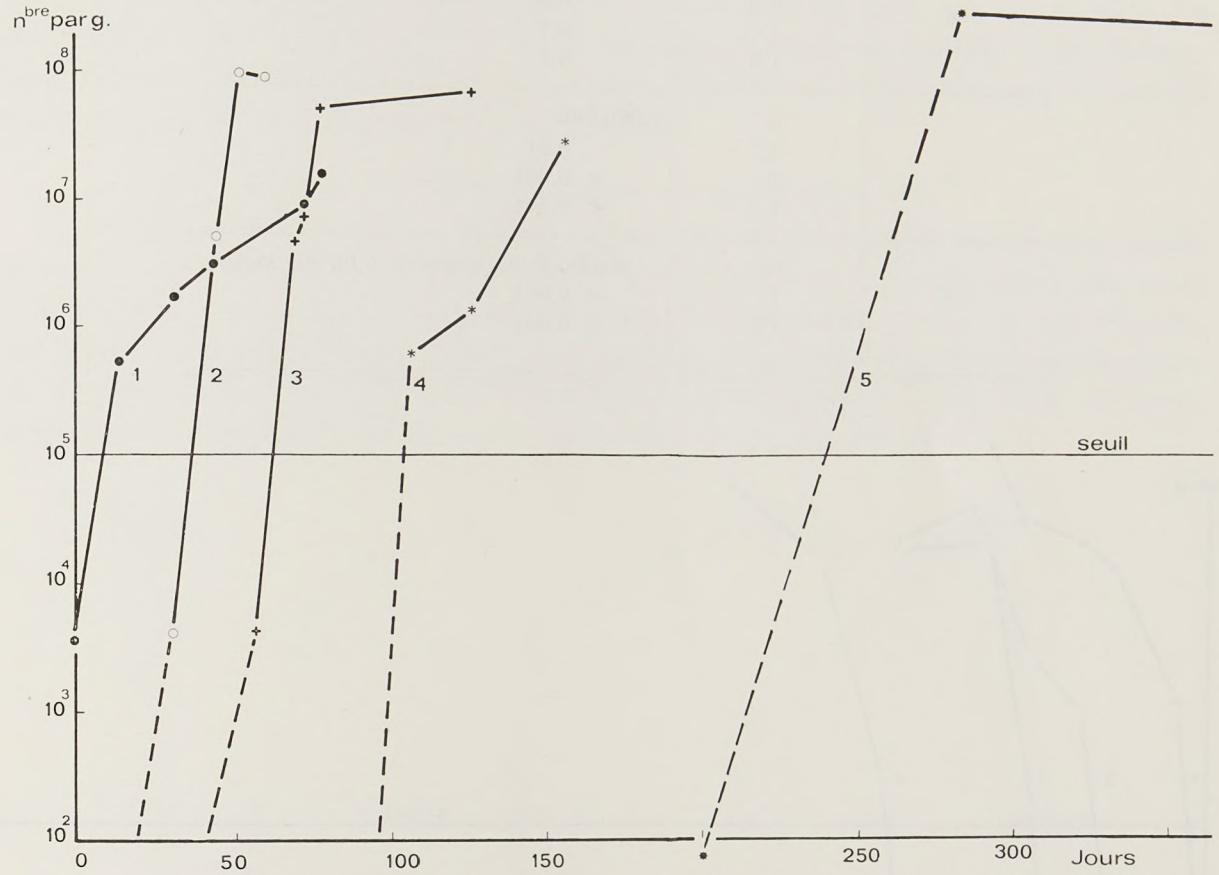


FIG. 10. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des moisissures* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 13°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 ; 5 : 1 p. 100
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

Les vitesses auxquelles les moisissures envahissent les grains sont à peu près identiques à 22°C et 13°C, un peu plus lentes à 5°C.

Seul, le *Penicillium roqueforti* se développe dans les lots traités, exception faite pour le lot traité avec 0,3 p. 100 d'acide propionique et stocké à 22°C dans lequel on observe, en plus, au début du stockage, un abondant développement de *Monoascus purpureus*, de *Gliocladium roseum* et de *Byssochlamys nivea*, tandis que dans le lot témoin les Micromycètes restent très diversifiés avec une forte prédominance de *Penicillium* (*P. oxalicum*, *P. pulvillorum*, *P. claviforme*) et la présence en quantité notable de *Cladosporium*, *Mucor* et *Trichoderma*.

Aucun développement d'*Aspergillus flavus* sur les grains traités n'a été mis en évidence, pas même dans le cas de grains expérimentalement pollués avec une

TABLEAU I

Évolution, en fonction de la durée du stockage et de la dose d'acide propionique, du nombre de micro-organismes par g de grain

Durée de stockage en jours	Dose d'acide propionique en p. 100	Milliers de micro-organismes par g de grain
0	0	20,5 *A. flavus* + 2 (divers)
	0,5	0,5 —
	1	0,7 —
	1,5	0,1 —
9	0	2 000 000 —
	0,5	0,01 —
	1	< 0,001 —
	1,5	< 0,001
40	0,5	80 000 *Penicillium* + 0,06 *A. flavus*
	1	< 0,001
	1,5	< 0,001

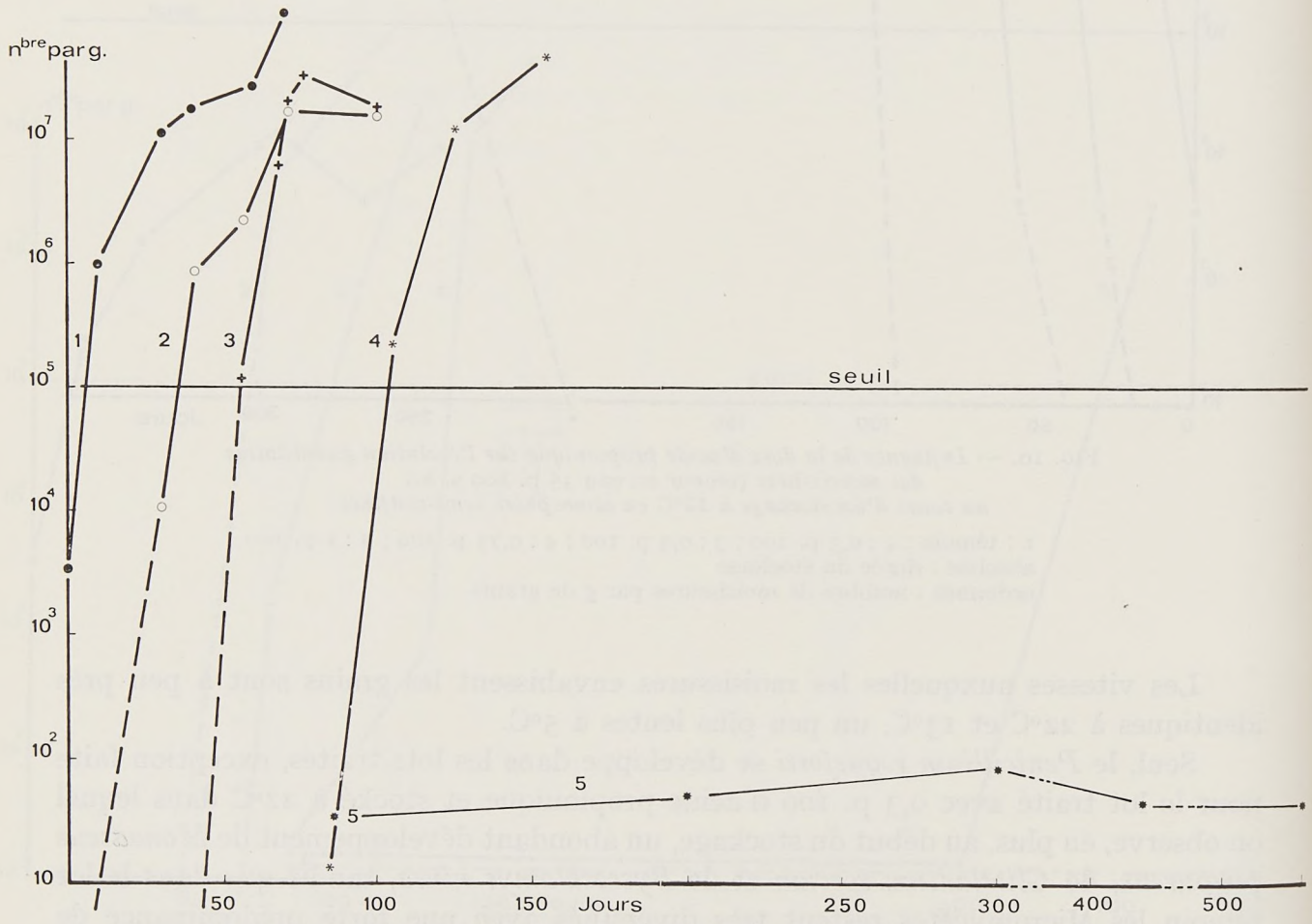


FIG. 11. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des moisissures des grains* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 22°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 ; 5 : 1 p. 100 ; 6 : 1,5 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

souche toxigène (V 37 34), puis traités avec l'acide propionique et stockés dans les conditions optimales de multiplication de cette moisissure. Ainsi, après une semaine de stockage à 30°C, le nombre initial de conidies d'*A. flavus* est multiplié par 10^5 dans le lot de grains témoin alors qu'il a régressé dans les lots traités par l'acide propionique ; après quarante jours de stockage, parmi les lots traités, seul est moisi celui qui a reçu une dose de 0,5 p. 100 d'acide, mais il est envahi par *Penicillium roqueforti* et non par *Aspergillus flavus* (tabl. 1).

Les levures réapparaissent un peu plus tardivement que les moisissures, mais peuvent également devenir abondantes surtout à 22°C et 13°C aux trois doses les plus faibles. Ainsi, après quatre mois de stockage à 22°C, on compte 1 000 levures par gramme de grain traité avec 0,75 p. 100 d'acide (soit 800 fois moins que de moisissures) et 15 millions après cinq mois de stockage.

2. 222. *Dans les lots ayant une teneur en eau de 21 p. 100.*

Le nombre de moisissures régresse dans tous les lots traités pendant la durée des essais (quinze mois), sauf dans les lots traités avec 0,3 p. 100 où après cinq mois la quantité de moisissures est importante. Dans les lots traités avec 0,5 p. 100 d'acide, une légère augmentation des germes résiduels est bien vite suivie d'une diminution. Les figures 12, 13 et 14 illustrent l'évolution des moisissures à 5°C, 13°C, et 22°C, évolution d'autant plus rapide que la température est plus élevée.

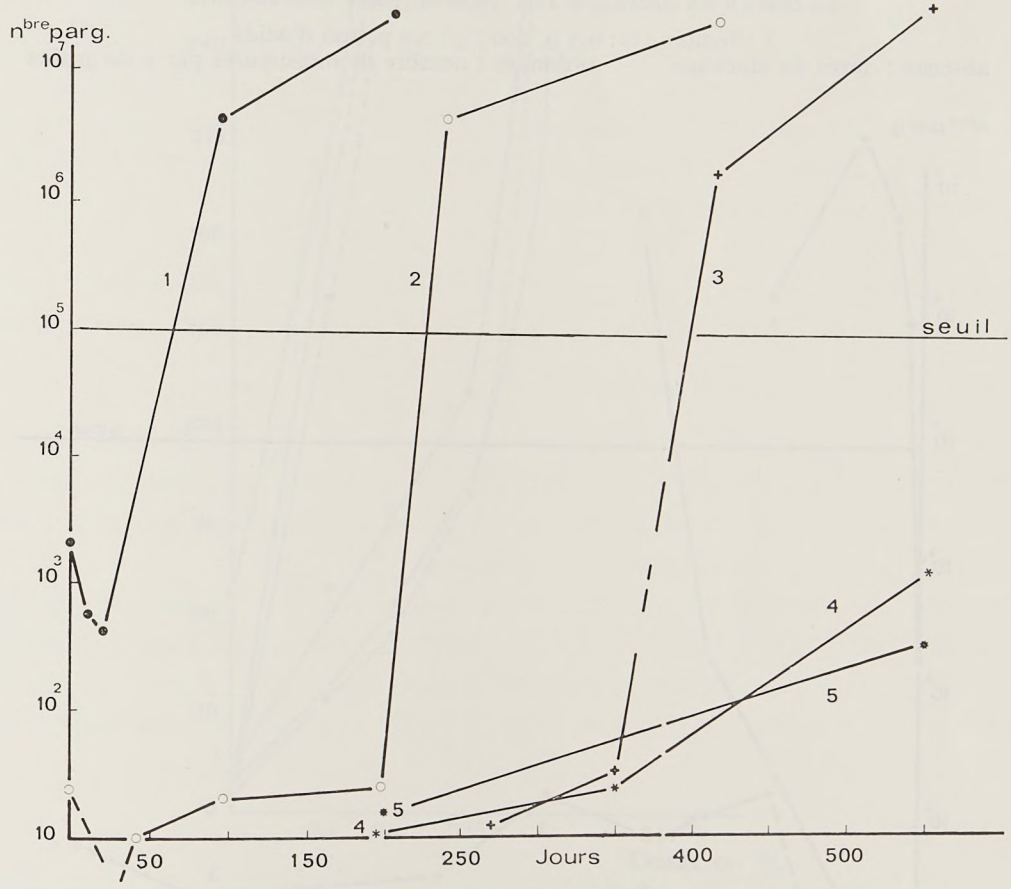


FIG. 12. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des moisissures des grains* (teneur en eau 21 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 5°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100 ; 5 : 1 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

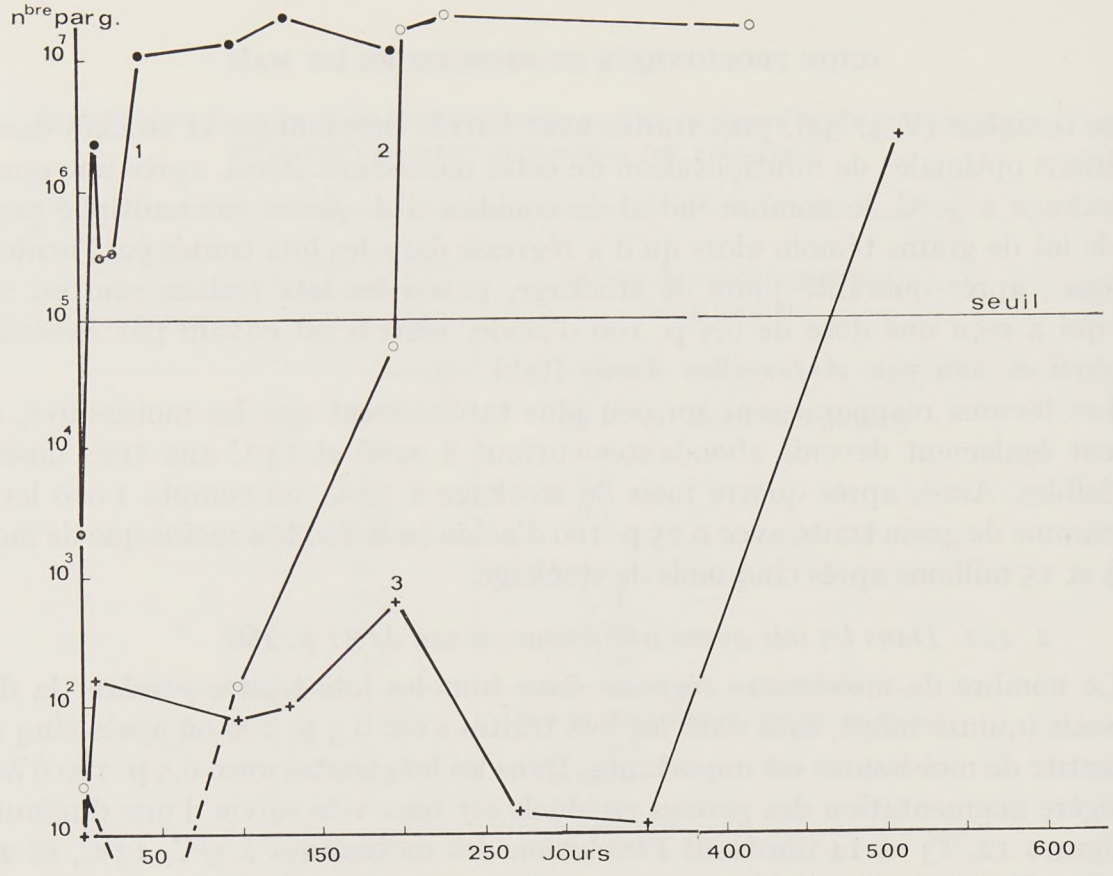


FIG. 13. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des moisissures des grains* (teneur en eau 21 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 13°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 d'acide
abscisse : durée du stockage ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

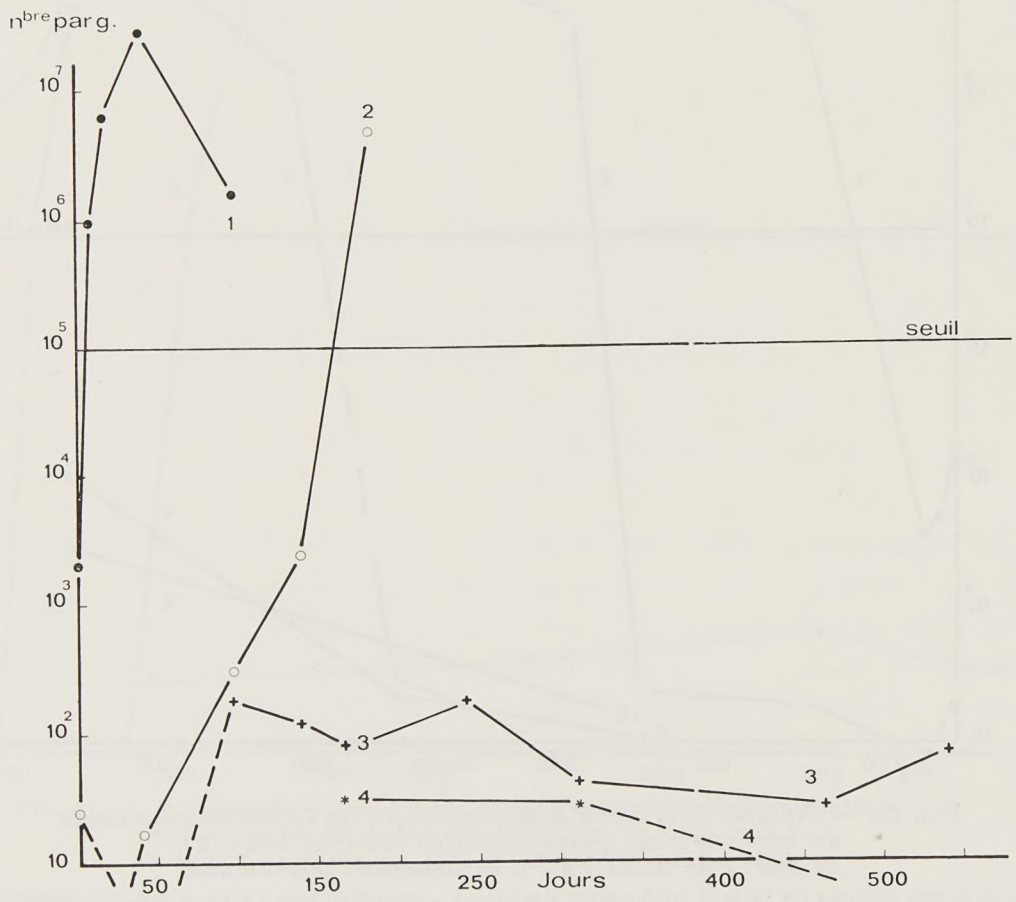


FIG. 14. — *Influence de la dose d'acide propionique sur l'évolution quantitative des moisissures des grains* (teneur en eau 21 p. 100 s. h.) *au cours d'un stockage à 22°C en atmosphère semi-confinée*

1 : témoin ; 2 : 0,3 p. 100 ; 3 : 0,5 p. 100 ; 4 : 0,75 p. 100
abscisse : durée du stockage ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

Comme dans les grains humides, c'est le *Penicillium roqueforti* qui prédomine finalement au côté des quelques *Aspergillus* du groupe *glaucus*, dans les lots où les moisissures se développent.

Les levures régressent dans tous les lots traités, alors que dans les témoins elles augmentent à 22°C et sont stables à 13°C.

3. — *Discussion et incidences pratiques*

3. 1. *Détermination des durées de conservation des grains traités puis stockés en atmosphère semi-confinée.*

A partir des résultats obtenus, il est possible d'ébaucher un diagramme indiquant la durée de conservation des grains en fonction de la dose d'acide propionique

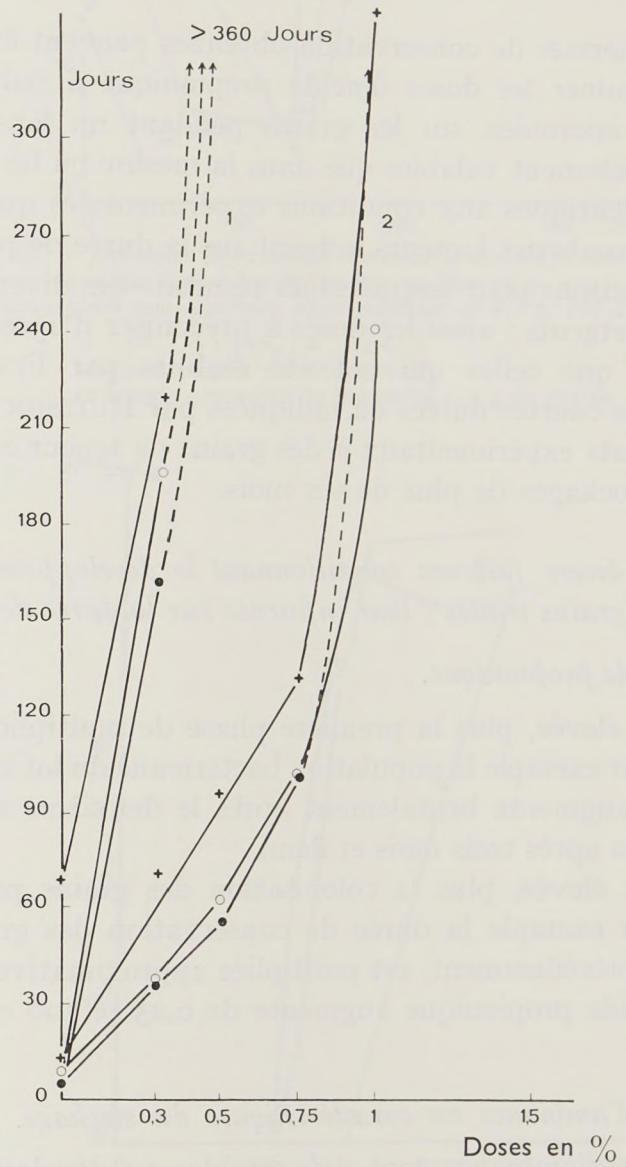


FIG. 15. — *Isothermes de conservation des grains de maïs traités par l'acide propionique, établis en choisissant comme critère de qualité l'importance de la population fongique des grains, le seuil à ne pas dépasser étant fixé à 10^5 germes par g de grains*

Teneur en eau des grains : 1 : 21 p. 100 s. h. ; 2 : 35 p. 100 s. h.
abscisse : dose d'acide propionique p. 100 de la masse de maïs humide ; ordonnée : durée du stockage.
+ : 5°C ; ○ : 13°C ; ● : 22°C.

utilisée et de la température de stockage pour les deux teneurs en eau étudiées : 21 et 35 p. 100. Pour établir un tel diagramme, l'importance du peuplement des grains par les moisissures peut être provisoirement retenue pour juger de leur état de conservation, ceci en l'absence de critères d'appréciation rapide et sensible de la qualité nutritionnelle des grains.

Le diagramme représenté par la figure 15 a été établi en fixant à 10^5 la valeur seuil du nombre de moisissures par gramme de grain, au-delà de laquelle le grain est considéré comme étant dégradé puisqu'il est alors légèrement, mais visiblement moisi. La valeur seuil de 10^5 devra certainement être abaissée devant la prise de conscience des risques de toxicité liés à une population fongique trop importante, mais on manque actuellement des données nécessaires pour établir une correspondance entre l'importance numérique et la nature des populations de moisissures sur les grains d'une part, et la qualité hygiénique du grain d'autre part.

Les courbes isothermes de conservation obtenues peuvent être utilisées, à titre indicatif, pour déterminer les doses d'acide propionique à pulvériser pour éviter tout développement microbien sur les grains pendant un laps de temps donné, mais elles ne sont strictement valables que dans la mesure où les conditions de stockage réalisées sont identiques aux conditions expérimentales qui ont permis de les établir. En effet, de nombreux facteurs influent sur la durée de protection du traitement. C'est une des raisons pour lesquelles les résultats des divers expérimentateurs sont quelque peu divergents ; ainsi les doses à préconiser d'après le graphique sont un peu plus faibles que celles qui ont été établies par FINK (1970) et SINGH-VERMA (1970) pour de courtes durées ou indiquées par HUITSON (1968) après extrapolation de ses résultats expérimentaux à des grains de teneur en eau supérieures à 30 p. 100 et à des stockages de plus de six mois.

3. 2. *Importance de divers facteurs conditionnant le développement des micro-organismes dans les grains traités ; leur influence sur la durée de conservation.*

3. 21. *Dose d'acide propionique.*

Plus la dose est élevée, plus la première phase de multiplication des bactéries est tardive ; à 13°C par exemple la population bactérienne du lot traité avec 0,5 p. 100 d'acide propionique augmente brutalement après le deuxième mois et celle du lot traité avec 0,75 p. 100 après trois mois et demi.

Plus la dose est élevée, plus la colonisation des grains par la mycoflore est retardée. A 13°C par exemple la durée de conservation des grains humides, telle qu'elle a été définie précédemment, est multipliée approximativement par 2 chaque fois que la dose d'acide propionique augmente de 0,25 p. 100 environ entre 0,3 et 1 p. 100.

3. 22. *Facteurs d'ambiance ou caractéristiques du stockage.*

Plus les facteurs d'ambiance sont défavorables au développement des micro-organismes, plus la période de stabilité des grains s'allonge.

Un léger confinement de l'atmosphère retarde la croissance des moisissures. Ainsi la durée de conservation d'un grain humide traité avec 1 p. 100 d'acide propionique est d'un mois et demi en atmosphère légèrement ventilée et saturée de vapeur

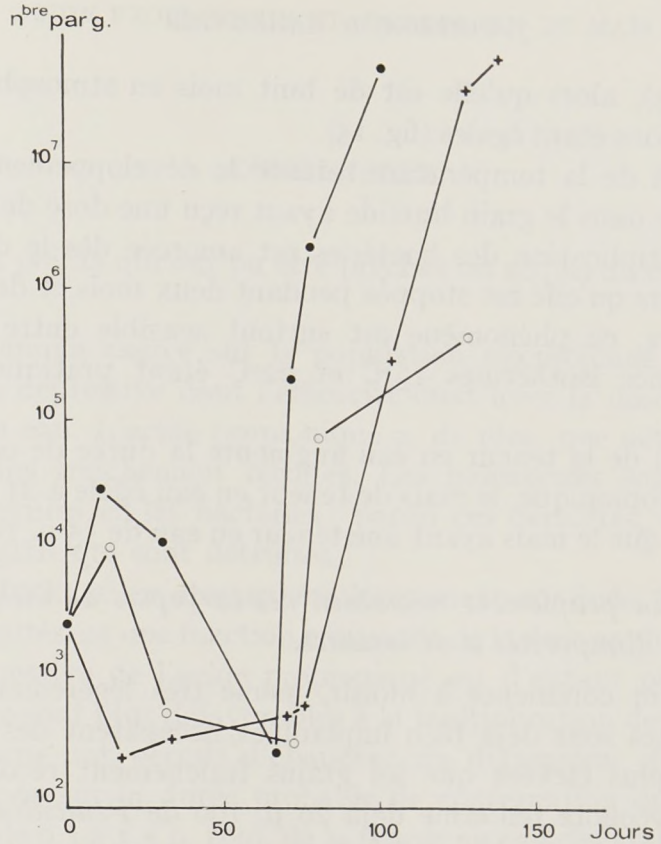


FIG. 16. — *Influence de la température sur le développement des bactéries dans du maïs humide* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *stocké en atmosphère semi-confinée, après addition de 0,5 p. 100 d'acide propionique*

+ : 5°C ; ○ : 13°C ; ● : 22°C
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de bactéries par g de grains

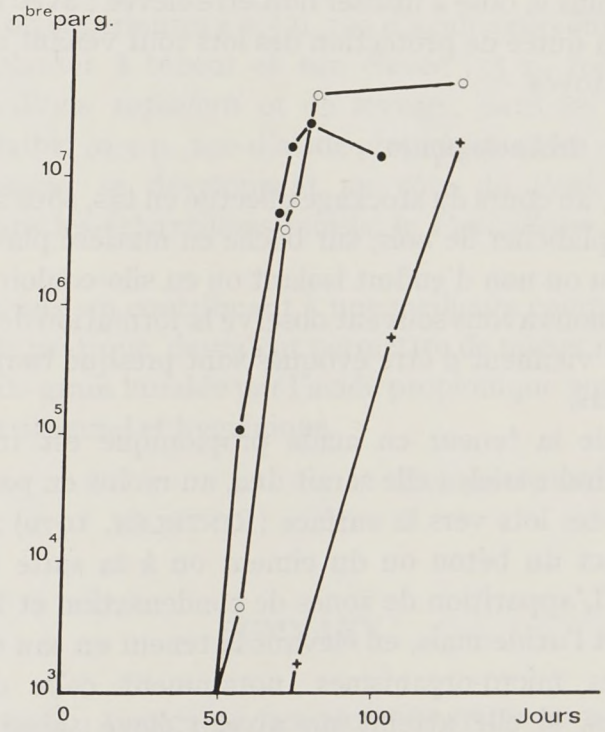


FIG. 17. — *Influence de la température sur le développement des moisissures dans du maïs humide* (teneur en eau 35 p. 100 s. h.) *stocké en atmosphère semi-confinée après addition de 0,5 p. 100 d'acide propionique*

+ : 5°C ; ○ : 13°C ; ● : 22°C
abscisse : durée du stockage
ordonnée : nombre de moisissures par g de grains

d'eau à 13°C (fig. 3), alors qu'elle est de huit mois en atmosphère semi-confinée, toutes autres conditions étant égales (fig. 15).

Un abaissement de la température retarde le développement des micro-organismes. Par exemple dans le grain humide ayant reçu une dose de 0,5 p. 100 d'acide propionique, la multiplication des bactéries est amorcée dès le début du stockage à 22°C et à 13°C alors qu'elle est stoppée pendant deux mois et demi à 5°C (fig. 16). Pour les moisissures, ce phénomène est surtout sensible entre 13°C et 5°C, les courbes de croissance isothermes 13°C et 22°C étant pratiquement confondues (fig. 17).

Une diminution de la teneur en eau augmente la durée de conservation : avec 0,3 p. 100 d'acide propionique, le maïs de teneur en eau égale à 21 p. 100 se conserve quatre mois de plus que le maïs ayant une teneur en eau de 35 p. 100.

3. 23. *Nature du peuplement microbien des caryopses au moment du traitement. Présence d'impuretés et de brisures.*

Les grains ayant commencé à moisir, même très légèrement, et sur lesquels les espèces résistantes sont déjà bien implantées, nécessitent des concentrations en acide propionique plus élevées que les grains fraîchement récoltés. Par exemple du maïs dont la mycoflore renferme déjà 20 p. 100 de *Penicillium* au moment du traitement avec 1 p. 100 d'acide propionique ne se conserve pas trois mois, alors que, dans les mêmes conditions de traitement et de stockage, du maïs fraîchement récolté, dont la mycoflore est surtout constituée par des espèces champêtres, se conserve huit mois.

Plus les grains renferment de brisures et d'impuretés (fragments de rafle, de feuilles, de terre, ...), plus la dose à utiliser doit être élevée ; avec une dose de 0,5 p. 100 d'acide par exemple la durée de protection des lots tout venant est moitié plus courte que celle des lots nettoyés.

3. 24. *Incidences technologiques.*

Dans la pratique, au cours du stockage effectué en tas, sous abri, sur terre battue, sur sol en béton, sur plancher de bois, sur bâche en matière plastique ou bien en silo butyl, en béton revêtu ou non d'enduit isolant ou en silo-couloir tapissé d'une bâche en matière plastique, nous avons souvent observé la formation de petits foyers d'infection. Les facteurs qui viennent d'être évoqués sont presque toujours à l'origine de la formation de ces foyers.

La diminution de la teneur en acide propionique est fréquemment signalée pendant les stockage industriels ; elle serait due, au moins en partie, à une migration de l'acide de la base des lots vers la surface (Rintelen, 1970) ; elle peut également se produire au contact du béton ou du ciment ou à la suite de condensations ou d'infiltrations d'eau. L'apparition de zones de condensation et les infiltrations d'eau non seulement diluent l'acide mais, en élevant la teneur en eau des grains, favorisent la multiplication des micro-organismes, notamment celle des bactéries saprophytes et pathogènes, si elle atteint un niveau élevé ; ainsi des *Escherichia coli* d'origine fécale ont été retrouvés en abondance dans le fond d'un silo de grains traités.

Enfin si des moisissures se développent, c'est toujours dans les zones où le confinement de l'air est peu poussé, à la surface des tas et près des ouvertures.

CONCLUSION

Les principaux points qui ont pu être précisés ou acquis au cours de notre étude sont les suivants.

L'acide propionique exerce sur la population microbienne globale des grains de maïs une action dépressive dont l'efficacité croît avec la dose d'acide utilisée et avec leur teneur en eau. L'acide propionique a, de plus, une action sélective sur la microflore des grains fraîchement récoltés. Les moisissures sont plus sévèrement touchées que les levures et les bactéries ; parmi ces dernières, ce sont surtout les bactéries Gram-négatif qui sont détruites.

Au cours du stockage en atmosphère légèrement confinée, la durée de conservation des grains traités est une fonction croissante de la dose appliquée. La protection due à l'action dépressive de l'acide propionique est d'autant plus durable que les facteurs d'ambiance sont plus défavorables à la multiplication des micro-organismes. Les résultats obtenus ont permis d'ébaucher un diagramme de conservation qui donne des indications sur la durée probable de conservation du maïs, en fonction de la dose utilisée (de 0,3 à 1,5 p. 100), de la teneur en eau des grains (21 et 35 p. 100) et de la température de stockage (5°C, 13°C et 22°C).

L'action sélective de l'acide propionique persiste durant le stockage. Dans les conditions de nos essais, les populations bactériennes qui se développent successivement sur les grains traités sont peu variées : ce sont des *Lactobacillus* puis des *Pseudomonadaceae* et enfin des *Bacillus cereus*.

Aux doses égales ou supérieures à 0,5 p. 100 d'acide propionique, la flore fongique qui parvient à s'implanter à teneur en eau élevée (35 p. 100 s.h.) est constituée uniquement de *Penicillium roqueforti* et de levures, dans les conditions réalisées. Alors qu'à dose plus faible (0,3 p. 100 d'acide propionique) des *Aspergillus* du groupe *glaucus* et du *Monoascus* se développent au côté du *Penicillium*. A la teneur en eau 21 p. 100, dans les échantillons moisis, le *Penicillium roqueforti* prédomine également.

Les résultats obtenus, en contribuant à une meilleure compréhension des phénomènes observés dans la pratique, devraient permettre de mieux maîtriser la technique de stabilisation du maïs-grain humide par l'acide propionique pour en faire un procédé fiable sur les plans nutritionnel et hygiénique.

Reçu pour publication en juin 1972.

SUMMARY

MICROBIOLOGICAL ASPECT OF THE PRESERVATION OF DAMP MAIZE TREATED WITH PROPIONIC ACID

Fresh corn (maize) crops of 35 and 21 p. 100 moisture contents have been treated with a quantity of propionic acid spreading from 0,3 to 1,5 p. 100, then stored for 17 months at temperatures of 5, 13 and 22°C in a slightly confined and renewed atmosphere.

The depressive effect of the treatment on the microflora of seeds depends on the quantity of acid and of the moisture content. The field fungi and the Gram-negative bacteria are the seeds microflora components which appear to be the most sensitive to the treatment.

During storage, several bacterial flora may develop on seeds (*Lactobacillus*, *Pseudomonas*, sporulating bacteria) : the higher the quantity of acid, the lower the rate of growth of bacteria. Among moulds, *Penicillium* especially will grow on seeds in course of time, when the protection due to propionic acid decreases.

The isochrones preservation curves established from the results enable to estimate the prospective preservation period of time of a treated crop according to storage characteristics and quantity of acid used. Many factors have an effect on the preservation time of the treatment : drop in quantity, increase in temperature, in moisture content, in oxygen content, in the division state of seeds, nature of the microflora attached from the beginning of storage.

RESUMEN

ASPECTO MICROBIOLOGICO DE LA CONSERVACION DEL MAIZ-SEMILLA HUMEDO POR EL ACIDO PROPIONICO

Diversos lotes de maíz recién cosechados, con contenidos de agua equivalentes a 35 y 21 p. 100, han sido tratados mediante dosis de ácido propiónico, escalonadas entre 0,3 y 1,5 p. 100 y, acto seguido, almacenados durante meses 17 a temperaturas de 5°C, 13°C y 22°C en atmosferas ligeramente confinadas y renovadas.

El efecto depresivo del tratamiento sobre la microflora de les semillas varía según la dosis de ácido y del porcentaje de agua de las semillas. Los mohos « del campo » y las bacterias Gram-negativo constituyen los elementos de la microflora de las semillas que manifiestan mayor sensibilidad al tratamiento.

Durante el transcurso del almacenamiento, varias floras bacterianas pueden sucederse en las semillas (*Lactobacillus*, *Pseudomonas*, bacterias esporutanes) según un ritmo tanto más lento cuanto más elevada es la dosis. Entre los mohos, aquello que, a la larga, llegan a implantarse en las semillas tratadas, son sobre todo los *Penicillium*, cuando disminuye la protección derivada del ácido propiónico.

Las curvas isócronas de conservación, establecidas tomando como base los resultados obtenido, permiten apreciar la duración probable de conservación de un lote tratado en función de las características del almacenamiento y de la dosis de ácido utilizada. Son numerosos los factores que influyen sobre la duración de protección del tratamiento : el debilitamiento de la dosis, el aumento de temperatura, el porcentaje de agua y de la ventilación, el estado de división de las semillas y el género de la microflora implantada al comienzo del almacenamiento.

RIASSUNTO

ASPETTO MICROBIOLOGICO DELLA CONSERVAZIONE DEL GRANTURCO-CHICCO UMIDO MEDIANTE ACIDO PROPIONICO

Dei lotti di granturco con tenori in acqua uguali a 35 e 21 p. 100 sono trattati subito dopo raccolta con delle dosi di acido propionico che vanno da 0,3 e 1,5 p. 100, poi immagazzinati durante diciassette mesi a 5°C, 13°C e 22°C in atmosfera leggermente chiusa e rinnovata.

L'effetto depressivo del trattamento sulla microflora dei chicchi varia con la dose d'acido e il tenore in acqua dei chicchi stessi. Le muffe « del campo » e i batteri Gram-negativo sono gli element' della microflora dei chicchi più sensibili el trettamento.

Durante l'immagazzinamento, più flore batteriche possono succedersi sui chicchi (*Lactobacillus*, *Pseudomonas*, batteri sporulanti) a un ritmo tanto più lento quanto più la dose à elevata. Tra le muffe, seno soprattutto delle *Penicillium* che, alla lunga, si fissano sui chicchi trattati quando diminuisce la protezione dovute all'acido propionico.

Le curve isocrone di conservazione stabilite a partire dai risultati ottenuti permettono di

valutare la durata probabile di conservazione di un lotto trattato in funzione delle carattetistiche d'immagazzinamento e della dose d'acido utilizzate. Numerosi fattori influiscono sulla durata di protezione del trattamento : la diminuzione della dose, l'elevazione della temperatura, del tenore in acqua e dell'aerazione, lo stato di divisione dei chicchi e la natura della microflora fissata all'inizio dell'immagazzinamento.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A. G. P. M., 1970 et 1971. *C. R. Réunion « Acide propionique ».*

Bosset B., 1970. L'acide propionique. *C. R. Réunion acide propionique, A.G. P. M.*, 8 avril, 6-10.

Bronsch K., 1970. Die Propionsäure. Ein Konservierungsmittel für Mischfutter. *Die Mühle*, **107** (31), 460-461.

Burrell N. J., Havers S. J., Biss P. M., Gordon S. L., Stephen C. J., Faulkner D., 1969. Storage of grain treated with propionic acid. *Pest infestation research, the report of the pest infestation laboratory*, 23.

Burrell N. J., Biss P. M., Gordon S. L., Stephen C. J., Jones J. R., 1971. Storage of grain treated with propionic acid (en préparation).

Buttiaux R., 1969. *Cours du C. E. R. B. A.* (non publié). Lille.

Cassagne H., 1961. *Milieux de culture. Collection technique de base.* Édition La Tourelle. Saint-Mandé.

Delié I., Žakula S., Vučurevic, Stojsavljevič T., Čurčié R., Lazor M., Vlahović M., Vučkévic M., 1970. *A study of moist corn preservation with propionic acid.* Institute of food industry. Feed technology department. Novi Sad.

Dumay C., Delort-Laval J., Zelter S.-Z., 1972. Qualité des ensilages de maïs-grain humide. Préservation par l'acide propionique. *Journées de la recherche porcine en France*, 127-129.

Février C., Bourdon D., Chombolle M., 1972. Valeur alimentaire du maïs humide conservé par l'acide propionique pour la truie et le porcelet, et du maïs ensilé pour le porc en croissance. *Journées de la recherche porcine en France*, 135-142.

Fink F., 1970. Die Propionsäure als Mittel zur Haltbarmachung von Frischgetreide. *B. A. S. F. Mitteilungen für den Landbau.* 74-89, 135-142.

Gaye A., 1972. Influence du traitement du maïs à l'acide propionique sur l'engraissement du porc charcutier. *Journées de la recherche porcine en France*, 143-147.

Geay Y., Liénard G., 1971. Influence du mode de conservation du maïs-grain sur son utilisation pour l'engraissement des taurillons. *Bull. techn. C. R. Z. V.*, **3**, 33-41.

Graham W. D., Teed H., Grice H. C., 1954. *J. Pharm. Pharmacol.*, **6**, 534.

Guilbot A., 1969. Dosage de l'eau dans le maïs humide. *Méthode proposée à l'I. C. C. pour normalisation.* Réunion de Paris. Mars.

Harshbarger K. E., 1942. Report of a study on the toxicity of several food preservating agents. *J. Dairy Sci.*, **25**, 169-174.

Heseltine W. W., 1952. Sodium propionate and its derivatives as basteriostatics and fungistatics. *J. Pharmacol.*, **4**, 577-581.

Hill C. H., 1952. Studies on the inhibition of growth of *Streptococcus faecalis* by sodium propionate. *J. Biol. Chem.*, **199**, 329-332.

Hoffmann C., Schweitzer T. R., Dalby G., 1938, 1939, 1940, 1941. Fungistatic properties of the fatty acids and possible biochemical significance. *Food Res.*, **4**, 539.

Horter R., Klein H., 1969. Untersuchungen über die Eignung verschiedener Verdünnungsflüssigkeiten und Kulturverfahren für die kulturelle Keimzählung an pelletierten Futtermittelproben. *Zbl. Bakteriol. Parasit-Infekt. Krankh. Hyg., I, Dtsch.*, **211** (2), 248-252.

Huitson J. J., 1968. Cereals preservation with propionic acid. *Process Biochem.*, **3** (11), 31-32.

Ingram M., Ottaway F. J. H., Coppock J. B. M., 1956. The preservative action of acid substances in food. *Chem. Industry*, 1154-1163.

Jones G. M., Donefer E., Elliot J. I., 1970. Feeding value for dairy cattle and pigs of high moisture corn preserved with propionic acid. *Can. J. anim. Sci.*, **50**, 483-489.

Kamihara T., 1968. Role of pyruvate metabolism in the growth of *Streptococcus faecalis* in the presence of propionate. *J. Bacteriol*, **97**, 151-155.

Kiesel A., 1913. In *Handbook of food additives*, 159. Thomas et Suria, New York.

Parneix P., Combe P., Février C., 1971. La conservation du maïs-grain à l'état humide et son utilisation zootechnique. *Bull. techn. Inform.*, (264, 265), 1019-1045.

Pochon J., de Bajac H., 1968. *Traité de microbiologie des sols.* Dunod, Paris.

Richards S. A., Lloyd D., 1966. The growth of *Aspergillus glaucus* sp. on propionate. *Biochem. J.*, **99** (3).

RINTELEN P., 1971. *Analyse de l'emploi de l'acide propionique sur céréales du point de vue de l'économie de l'exploitation.* Institut de l'Économie rurale, Weihenstephan.

SAINT-LEBE L., PELEGRIN P., GUILBOT A., 1966. Étude d'un traitement combiné pour le conditionnement du maïs récolté humide : irradiation gamma et séchage par ventilation contrôlée. *Food irrad.* 439-454. International atomic energy agency, Vienna.

SINGH-VERMA S. B., 1970. Über den Einsatz der Propionsäure zur Konservierung von industriell hergestellten Mischfuttermitteln sowwie von feuchten Getreide und Maïs. Ergebnisse der Mikrobiologischen Untersuchungen. *Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg.*, **125** (1), 100-111.

SINGH-VERMA S. B., 1971. Einsatz der Propionsäure zur Nachkonservierung von Getreide und Kornermais sowie ihr Wirkungsmechanismus. *Landw. Forsch*, 71-86.

SPICHER G., 1970. Auswirkungen einer Propionsäure-Behandlung von Getreide auf eine Mikroflora und das backtechnische Verhalten des Mehles. *Getreide Mehl*, **9**, 73-80.

WRIGHT L. D., SKEGGS H. R., 1946. *Arch. Biochem.*, **10**, 384.

YOUNG L. G., BROWN R. G., SHARP B. A., 1970. Propionic acid preservation of corn for pigs. *Can. J. anim. Sc.*, **50**, 711-715.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (2), 123-130.

OXYDATION DES SUBSTANCES POLYPHÉNOLIQUES DES CERISES AU COURS DU BROYAGE

S. I. YANKOV

Institut supérieur des Industries alimentaires,
Lenin 26
Plovdiv (Bulgarie)

RÉSUMÉ

L'oxydation des substances polyphénoliques a été étudiée au cours du broyage des fruits de quatre variétés de cerises : *Lambert, Hedelfingen, Napoléon* et *Drogan jaune*. On a établi que, pendant le broyage des cerises durant cinq minutes, environ 50 p. 100 des polyphénols présents dans les fruits se dégradent. On a constaté une plus grande dégradation des colorants anthocyaniques comparativement à celle des polyphénols totaux. L'oxydation spontanée des cerises s'accompagne d'une dégradation très importante de la couleur naturelle des fruits. En utilisant le colorimètre Gardner, on a noté une diminution de la couleur rouge et une intensification de la couleur jaunâtre pour les variétés de cerises colorées. Pour les variétés à chair jaune, l'oxydation provoque une diminution de la teinte claire allant jusqu'au brunissement, une diminution de l'intensité de la couleur jaunâtre et une augmentation de l'intensité de la couleur rougeâtre.

Mots clés : *cerises, polyphénols, broyage, couleur, oxydation.*

INTRODUCTION

Presque toutes les substances polyphénoliques participent activement au métabolisme cellulaire des plantes. Elles ont une grande influence sur les divers phénomènes physiologiques. La composition quantitative et qualitative des substances polyphénoliques influe considérablement sur les caractéristiques gustatives et sur la couleur des fruits. La plus grande partie des substances polyphénoliques est localisée dans le suc vacuolaire. Pendant la transformation technologique, très souvent la couleur naturelle des tissus des fruits change. Une oxydation partielle des substances polyphénoliques se produit. La vitesse et l'importance de cette oxydation dépendent dans une large mesure de la concentration et de la nature de ces substances, de l'activité de la polyphénoloxydase et de bien d'autres facteurs. Cette oxydation des fruits est un processus indésirable qui se produit obligatoirement au cours du dénoyautage, opération préalable à de nombreuses utilisations industrielles des

cerises. Elle s'accompagne de dégradation de la qualité gustative des produits obtenus : jus, confiture,... et de la diminution de leur valeur nutritionnelle (Bogdanski, 1953 ; Heintze, 1955).

Au cours de travaux antérieurs, nous avons étudié le brunissement qui se produit pendant le découpage et le broyage de quelques variétés de pommes, de coings et de pêches (Dang Thi Fung et Yankov, 1971 ; Yankov, 1971 *a* et *b*). Les travaux que nous rapportons ici concernent l'oxydation des substances polyphénoliques et le changement de couleur des cerises pendant leur broyage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Les cerises proviennent des vergers de l'Institut de Recherches scientifiques arboricoles, situé près de Plovdiv, et de la récolte 1971. Les fruits avaient atteint leur maturité technologique. Les cerises ont été lavées et dénoyautées à l'aide d'un poinçon en bois. Les fruits ainsi préparés ont été soumis à l'analyse.

L'activité de la polyphénoloxydase a été déterminée par la méthode colorimétrique de Willstätter décrite par Bottger (1961). Comme substrat, on a utilisé du pyrogallol 0,025 M en solution tampon phosphate, pH : 5,9. L'activité de la polyphénoloxydase a été exprimée en milligrammes de purpurogalline formée par gramme de fruit frais, pendant cinq minutes, à une température de 20°C.

L'oxydation des fruits a été réalisée par broyage dans un mixer Braun, pendant des temps variant de 0,5 à 5 minutes. Au cours du broyage se produit une aération spontanée. On a mis dans le bol du mixer 400 g de cerises et 125 ml d'eau distillée. La réaction a été arrêtée en ajoutant 75 ml de solution à 10 p. 100 d'acide phosphorique et en procédant à un broyage complémentaire de 30 secondes (Dang Thi Fung et Yankov, 1971 ; Yankov, 1971 *a* et *b*). Pour le témoin, la solution d'acide phosphorique a été ajoutée avant le broyage. La température de la masse a été maintenue à 20°C à l'aide d'un réfrigérant à eau en acier inoxydable installé dans le bol du mixer. Après broyage, les échantillons ont été désaérés par pulvérisation sous vide.

L'extraction des substances polyphénoliques des échantillons broyés a été réalisée par l'alcool éthylique à 70 p. 100, pendant une nuit au réfrigérateur à 4°C. Les polyphénols totaux ont été déterminés par colorimétrie en utilisant le réactif de Folin-Denis selon le mode opératoire décrit par Sapis et Ribéreau-Gayon (1968). La courbe d'étalonnage a été établie à partir d'acide chlorogénique. La lecture a été faite au photocolorimètre FEK-M 57 avec filtre rouge. Les anthocyanes totales ont été évaluées par la méthode de Fuleki et Francis (1968).

Le changement de couleur des tissus de fruits a été déterminé par mesure directe (réflectométrie) sur les échantillons désaérés à l'aide du colorimètre Gardner (Luh, Tate et Villareal, 1963). Pour les variétés *Lambert* et *Hedelfingen*, nous avons utilisé la plaque rouge standard ($L = 24,8$; $a = 27,7$; $b = 12,7$) et pour les variétés *Napoléon* et *Drogan jaune* la plaque jaune standard ($L = 52,8$; $a = -3,9$; $b = 30,2$).

RÉSULTATS

Le tableau 1 indique les caractères analytiques des fruits avant broyage.

Les résultats expérimentaux de l'oxydation des substances polyphénoliques sont groupés dans le tableau 2 et représentés par les figures 1, 2 et 3.

Les données du tableau 2 montrent qu'à la suite de l'oxydation les polyphénols totaux diminuent considérablement dans toutes les variétés de cerises étudiées. L'oxydation des polyphénols est plus intense pendant les 2 ou 3 premières minutes que pendant les minutes suivantes. Cela est dû vraisemblablement à la diminution de la concentration générale des polyphénols présents et à l'activité inhibitrice des

TABLEAU I

Caractères analytiques des fruits

Variétés	Matière sèche (p. 100)	pH	Activité de la polyphénol-oxydase
Lambert	19,2	3,6	17
Hedelfingen	17,4	3,9	29
Napoléon	16,5	3,8	37
Drogan jaune	16,6	4,0	34

L'activité de la polyphénoloxydase est exprimée en mg de purpurogalline formée par g de fruit frais, pendant 5 minutes, à 20°C.

TABLEAU 2

Oxydation des substances polyphénoliques et variation de la couleur de certaines variétés de cerises au cours du broyage

Variétés	Temps de broyage (mn)	Polyphénols totaux	Polyphénols oxydés	Anthocyanes totales mg p. 100 g de pulpe	Couleur selon Gardner		
					L	*a*	*b*
Lambert	Témoin	300	10	18,2	9,2	12,5	— 6,5
	0,5	288	12	17,0	9,6	12,3	— 5,5
	1	258	42	13,5	10,1	12,2	— 5,0
	2	234	66	7,8	12,1	12,1	0,2
	3	204	96	5,8	13,3	10,8	1,0
	4	187	113	3,4	14,5	9,8	2,6
	5	180	120	2,9	14,6	9,4	2,7
Hedelfingen	Témoin	340	0	40,2	8,3	14,7	— 7,7
	0,5	324	16	31,0	8,8	14,0	— 6,6
	1	312	28	21,3	9,4	13,8	— 5,8
	2	270	70	11,6	10,9	12,7	— 4,1
	3	218	122	7,8	12,7	11,4	0,7
	4	206	134	5,3	13,2	10,2	1,3
	5	190	150	3,9	13,7	9,3	1,9
Napoléon	Témoin	366	0	—	21,6	11,6	7,0
	0,5	267	99	—	20,2	10,3	7,2
	1	284	132	—	19,9	8,4	7,7
	2	188	178	—	19,2	7,9	7,6
	3	174	192	—	19,1	7,6	7,6
	4	159	207	—	18,7	7,6	7,4
	5	150	216	—	18,2	7,5	7,0
Drogan jaune	Témoin	276	0	—	34,2	— 3,5	15,4
	0,5	219	57	—	29,9	2,5	12,9
	1	198	78	—	28,9	3,8	12,4
	2	171	105	—	26,0	4,9	11,9
	3	153	123	—	24,1	7,9	10,5
	4	149	134	—	22,8	7,5	10,2
	5	134	142	—	21,8	6,8	8,5

Les polyphénols sont exprimés en acide chlorogénique (mg p. 100 g de pulpe).

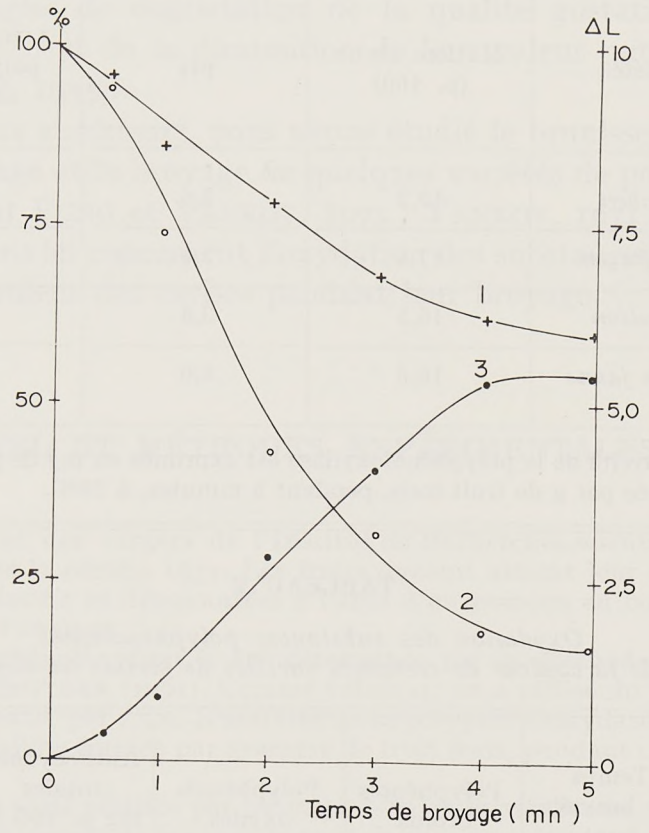


Fig 1

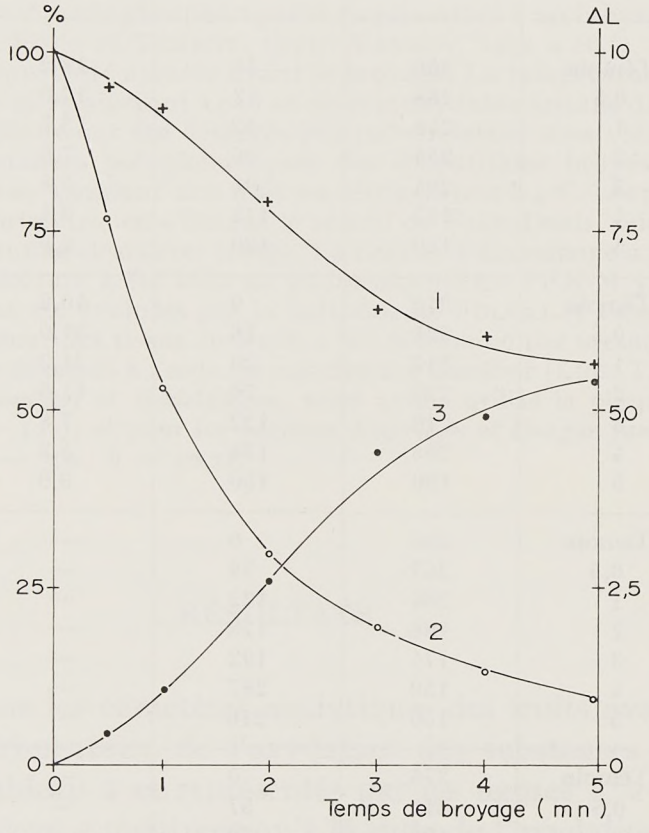


Fig 2

FIG. 1 et 2. — *Dynamique de l'oxydation des substances polyphénoliques des cerises en fonction du temps de broyage*

(1 = variété *Lambert*; 2 = variété *Hedelfingen*)

Courbe 1 : Pourcentage de polyphénols totaux non oxydés par rapport à la teneur initiale.
Courbe 2 : Pourcentage d'anthocyanes totales non oxydées par rapport à la teneur initiale.
Courbe 3 : Variation de la luminance (△L) à partir de sa valeur initiale.

produits de la réaction sur les polyphénoloxydases. La quantité de substances polyphénoliques oxydées au bout de 5 minutes et la teneur initiale de ces substances dans les fruits présentent une certaine corrélation. Dans les variétés de cerises les plus riches en polyphénols, il y a davantage de polyphénols oxydés.

Pendant le broyage, les substances phénoliques totales solubles dans l'alcool diminuent, alors que les colorants anthocyaniques disparaissent rapidement. Ceci apparaît nettement pour les variétés rouges *Lambert* et *Hedelfingen* d'après les résultats du tableau 2 et les figures 1 et 2.

Parallèlement à l'oxydation des polyphénols intervient un changement de couleur considérable des fruits broyés. L'indice *L* caractérise la luminance des fruits. Pour les variétés de couleur rouge *Lambert* et *Hedelfingen*, l'indice *L* s'accroît. Cela signifie que l'intensité de la couleur diminue. Elle pâlit pour atteindre graduellement une nuance chocolat.

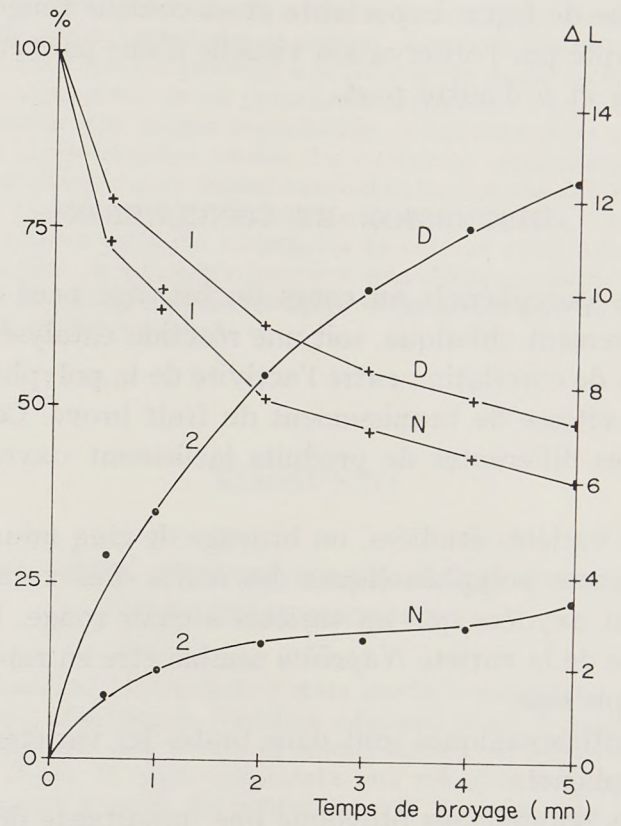


FIG. 3. — *Dynamique du brunissement des cerises en fonction du temps de broyage* (N = variété *Napoléon* ; D = variété *Drogan jaune*)

Courbe 1 : Pourcentage de polyphénols totaux non oxydés par rapport à la teneur initiale.
Courbe 2 : Variation de la luminance (△L) à partir de sa valeur initiale.

L'indice *a* des cerises rouges diminue considérablement au cours de l'oxydation, ce qui entraîne la diminution de la teinte rougeâtre. La couleur rouge diminue plus fortement pour la variété *Hedelfingen* que pour la variété *Lambert*.

Les valeurs négatives de l'indice *b* expriment une couleur bleuâtre, tandis que les valeurs positives se rapportent à une couleur jaunâtre. Pour les cerises rouges et les échantillons broyés comme témoins, l'indice *b* a une valeur négative jusqu'à la deuxième minute, ce qui indique la présence d'une couleur bleuâtre. Son intensité diminue graduellement. Après 3 minutes apparaît une couleur jaunâtre qui s'accentue graduellement.

Comme cause de l'altération de la couleur des cerises, on peut invoquer la dégradation des colorants anthocyaniques et d'autres substances polyphénoliques, ainsi que celle des produits intermédiaires et finaux de la réaction présentant une couleur jaunâtre et chocolat. Le broyage des variétés de cerises à chair jaune *Napoléon* et *Drogan jaune* s'accompagne également d'une dégradation importante de la couleur naturelle. La variété *Napoléon* a une plus faible valeur de luminance comparativement à la variété *Drogan jaune*. Cela est dû probablement à l'influence de la couleur rouge partielle de la peau, qui diminue de façon notable pendant le broyage. Pendant le broyage, la luminance de ces fruits diminue fortement ; en outre ils brunissent. Pour la variété *Drogan jaune*, on note une plus grande différence dans la luminance de la partie charnue de l'échantillon broyé comme témoin, comparativement avec la variété *Napoléon* (tabl. 2, fig. 3).

Au cours de l'oxydation, la couleur jaune de la partie charnue de la variété *Drogan jaune* diminue de façon importante et sa couleur rougeâtre s'intensifie. On peut s'en rendre compte par l'observation visuelle d'une part et par la variation des valeurs des indices *a* et *b* d'autre part.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'oxydation des polyphénols au cours du broyage peut avoir deux origines, soit une réaction purement chimique, soit une réaction catalysée par la polyphénoloxydase. Il n'y a pas de corrélation entre l'activité de la polyphénoloxydase mesurée dans les fruits et la vitesse de brunissement du fruit broyé. Ceci peut être dû à la présence de quantités différentes de produits facilement oxydables, tel l'acide ascorbique.

Dans les quatre variétés étudiées, un broyage de cinq minutes dégrade environ la moitié des substances polyphénoliques des fruits. Les variétés à chair blanche sont plus rapidement oxydées que les variétés à chair rouge. L'oxydation particulièrement importante de la variété *Napoléon* semble être en rapport avec une teneur plus élevée en polyphénols.

Les colorants anthocyaniques sont dans toutes les variétés plus oxydables que l'ensemble des polyphénols.

L'oxydation des polyphénols provoque une importante dégradation de la couleur naturelle des cerises. Pour les cerises rouges, la luminance s'accroît, la teinte rouge diminue et la teinte jaunâtre s'intensifie. Pour les cerises à chair jaune, la luminance et la teinte jaune diminuent d'intensité alors que la couleur rougeâtre s'intensifie.

Reçu pour publication en juillet 1972.

SUMMARY

OXYDATION OF POLYPHENOLIC SUBSTANCES OF CHERRIES DURING CRUSHING

Oxydation of polyphenolic substances was studied during the crushing of the fruits of four varieties of cherry : *Lambert, Hedelfingen, Napoleon* and *Drogan jaune*. It was proved that during five minutes'crushing of the cherries, about 50 p. 100 of the polyphenols present in the fruits

are degraded. A greater degradation of anthocyanic pigments, compared with that of total polyphenols, was observed. Spontaneous oxydation of the cherries is accompanied by a very considerable degradation of the fruits'natural colour. Using the GARDNER colorimeter, a decrease in red and intensification of the yellowish colour was noted for the coloured cherry varieties. For the varieties with yellow flesh, oxydation causes a decrease in the clear hue going as far as dark brown, a decrease in intensity of the yellowish colour and an increase of intensity of the reddish colour.

RESUMEN

OXIDACION DE LAS SUSTANCIAS POLIFENOLICAS DE LAS CERIZAS DURANTE EL TRANSCURSO DE LA TRITURACIÓN

La oxidación de las sustancias polifenólicas ha sido estudiada durante el transcurso de la trituración de las frutas de cuatro variedades de cerezas : *Lambert, Hedelfingen, Napoleon* y *Drogan jaune*. Se ha podido establecer que, al proceder a la trituración de las cerezas durante cinco minutos, un 50 p. 100 aproximadamente de los polifenoles presentes en las frutas se degradan. También se ha podido comprobar una mayor degradación de los colorantes antociánicos comparativamente con aquella de los polifenoles totales. La oxidación espontánea de las cerezas queda acompañada por una degradación muy importante del color natural del fruto. Utilizando el colorímetro GARDNER, se ha podido poner de manifiesto una disminución del color rojo y una intensificación del color amarillento para las variedades de cerezas cuyo color es acusado. Para las variedades de pulpa amarilla, la oxidación provoca una disminución de la tonalidad clara que llega incluso hasta el color pardo, una disminución de la intensidad de color amarillento y un aumento de la intensidad del color rojizo.

RIASSUNTO

OSSIDAZIONE DELLE SOSTANZE POLIFENOLICHE DELLE CILIEGIE DURANTE LA MACINATURA

L'ossidazione delle sostanze polifenoliche è stata studiata durante la macinature di quattro varietà di ciliegie : *Lambert, Hedelfingen, Napoléon* e *Drogan jaune*. E' stato stabilito che durante la macinatura delle cicliegie per una durata di cinque minuti, si degradano circa 50 p. 100 dei polifenoli presenti nella frutta. E' stato constatata una più grande degradazione dei coloranti antocianici comparativemente a quella dei polifenoli totali. L'ossidazione spontanea delle ciliegie è accompagnata da una degradazione molto importante del colore naturale della frutta. Impiegando il colorimetro GARDNER, è stata notata una diminuzione del colore rosso e una intensificazione del colore giallastro per le varietà di ciliegie colorate. Per le varietà con polpa gialla, l'ossidazione provoca una diminuzione della tinta chiara che va fino all'inscurimento, una diminuzione dell'intensità del colore giallastro e un aumento dell'intensità del colore rossastro.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOGDANSKI K., 1953. *Przemysl Rolny i Spoziwczy*, (1), 15-19.

BOTTGER H., 1961. Die Activität der Peroxidase und Polyphenoloxidase in Fruchten und Gemüse. *Z. Lebensmittel Unters. u. Forsch*, (115), 527.

DANG THI FUNG, YANKOV S. I., 1971. Le brunissement enzymatique de quelques fruits à noyaux. *Travaux scientifiques de l'Institut supérieur des Industries alimentaires*. Plovdiv, **18** (1) (en bulgare).

FULEKI T., FRANCIS F. J., 1968. Quantitative methods for anthocyanins. II. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.*, **33** (1), 78-83.

Heintze K., 1955. Zur Frage der Braunreaktion in Lebensmitteln. *Deutsc. Lebensmitteln Runds.*, (3), 69-75.

Luh B. S., Tate T. N., Villareal, 1963. Polyphenoloxidase Activität und Braunung bei Barlett-Birnen. *Fruchtsaft Ind.*, (5), 274-282.

Sapis J. C., Ribéreau-Gayon P., 1968. Transformation des composés phénoliques au cours du brunissement des vins blancs. *Conn. Vigne Vin*, (4), 323-348.

Yankov S. I., 1971 *a*. Le brunissement enzymatique de quelques variétés de pommes (en bulgare ; sous presse).

Yankov S. I., 1971 *b*. Le brunissement enzymatique des coings (en bulgare ; sous presse).

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (2), 131-143.

SÉPARATION DES ACIDES AMINÉS DU MOÛT DE RAISIN PAR FILTRATION SUR GEL DE DEXTRANE RÉTICULÉ (« SEPHADEX ») ET ANALYSE QUALITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

M. FEUILLAT et M. DEMAIMAY
avec la collaboration technique de E. POITRAT

Laboratoire de Chimie et de Technologie agricole,
E. N. I. T. A.
21800 Quétigny

RÉSUMÉ

Les acides aminés libres d'un moût de raisin de *Vitis vinifera*, cépage *Chardonnay*, sont isolés par chromatographie sur Sephadex G 25 afin d'éliminer les peptides, puis purifiés par passage sur Sephadex G 10 et sur échangeur d'ions. L'extrait ainsi obtenu est utilisé pour la préparation de dérivés *n*-butyl N-trifluoroacétylés selon la technique de GEHRKE *et al.* (1968), puis soumis à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse sur deux colonnes de polarités différentes.

La sensibilité obtenue pour la détermination qualitative des acides aminés (de 0,1 à 0,05 µg) permet d'envisager l'application de la technique à l'analyse d'échantillons très peu concentrés, tels que les hydrolysats de fractions protéiques obtenues par séparation sur des Sephadex d'indices de gonflement élevés (G 100 ou G 200).

Toutefois, des difficultés demeurent pour le traitement des acides aminés basiques, et en particulier pour le traitement de l'arginine dont la préparation du dérivé pose des problèmes de solubilité et dont le coefficient de réponse est très faible.

Mots clés : *moût de raisin, acides aminés, séparation sur Sephadex, chromatographie en phase gazeuse.*

I. — INTRODUCTION

La chromatographie en phase gazeuse des acides aminés a fait son apparition ces dernières années, à la suite notamment des travaux de GEHRKE et SHAHROKHI (1966) qui préparent les dérivés *n*-butyl N-trifluoroacétylés.

L'application de cette technique à l'analyse des acides aminés libres du vin et du jus de raisin a déjà été réalisée par CAMPOS et SEVERIN (1970) et par FERNANDEZ-FLORES *et al.* (1970).

Ces auteurs obtiennent des résultats positifs, en utilisant notamment la colonne EGA (Ethylene Glycol Adipate), mais la préparation des échantillons étant conduite par simple passage sur échangeur d'ions, CAMPOS et SEVERIN signalent l'hydrolyse de peptides au cours de la préparation des dérivés *n*-butyl N-trifluoroacétylés.

Le présent travail a été entrepris dans le cadre d'une étude des matières azotées du moût de raisin et plus particulièrement des protéines par chromatographie sur gel de dextrane réticulé (Sephadex G 25). Le principe de cette technique, qui aboutit au fractionnement des substances azotées selon leur poids moléculaire, permet d'envisager la séparation des peptides et des acides aminés libres.

La qualité de cette séparation nous apparaît comme particulièrement importante dans l'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des acides aminés d'un milieu biologique aussi complexe que le moût de raisin, car, comme cela a déjà été signalé, la préparation des dérivés volatils entraîne une hydrolyse de peptides s'ils ne sont pas complètement éliminés de l'échantillon traité. De plus, la filtration sur le Sephadex G 10 permet d'éliminer les polyphénols du raisin d'une façon plus complète qu'un simple passage sur échangeur d'ions.

En ce qui concerne l'analyse chromatographique proprement dite, nous avons expérimenté une colonne non encore utilisée pour la séparation des acides aminés et constituée par la succession de deux phases : XE-60 et DEXIL-300. Les résultats rapportés dans ce mémoire portent uniquement sur l'analyse qualitative des acides aminés libres d'un moût de raisin, mais la très grande sensibilité obtenue laisse envisager un intérêt tout particulier de la technique pour l'étude d'échantillons très faiblement concentrés tels que les hydrolysats de fractions protéiques séparées en microquantités sur des Sephadex d'indices de gonflement élevés (G 100, G 200).

II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — *Nature des échantillons*

Les essais ont été réalisés sur un moût de raisin *Vitis vinifera*, du cépage *Chardonnay*, récolté par le domaine de l'Université de Dijon à Marsannay-la-Côte (Côte-d'Or).

Les échantillons ont été prélevés au moment de la vinification et conservés par congélation, sans addition d'anhydride sulfureux.

L'analyse est effectuée après une clarification obtenue par filtration sur coton de verre, puis par centrifugation.

Les caractéristiques analytiques du moût sont les suivantes : sucre en g par litre : 231 ; acidité totale en g de H_2SO_4 par litre : 6,5 ; azote total (Kjeldahl) en mg par litre : 695 ; azote titrable en présence de formol en mg par litre : 283.

B. — *Isolement et purification des acides aminés*

1. *Chromatographie sur gel de dextrane réticulé.*

Les gels utilisés sont les Sephadex G 25 et G 10. Après gonflement dans le tampon, les gels sont coulés dans des colonnes « Pharmacia » de type K 25-100 (d'une hauteur de 100 cm et d'une section de 4,9 cm^2) pour le Sephadex G 25, et de type K 25-45 (d'une hauteur de 45 cm et d'une section de 4,9 cm^2) pour le Sephadex G 10.

Les colonnes sont étalonnées par passage d'un polymère de haut poids moléculaire (solution de « blue dextran » à 2 p. 1 000) en vue de déterminer le volume d'exclusion V_0.

La chromatographie est toujours ascendante. Elle est conduite à partir d'échantillons d'un volume de 10 ml et avec un débit de 40 ml/heure. L'éluant est le tampon acétate pH = 6 mélangé volume à volume avec une solution de NaCl 0,1 M.

L'éluat est collecté automatiquement par fractions de 3 ml, qui sont étudiées par absorption dans l'ultraviolet (278 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre couplé avec un enregistreur.

2. *Coloration à la ninhydrine.*

Le réactif utilisé est constitué par le mélange à volumes égaux d'une solution de ninhydrine à 4 p. 100 dans le méthylcellosolve dilué au demi et d'un tampon citrate 0,2 M de pH = 5, renfermant 0,16 p. 100 de chlorure stanneux.

Le mélange de 0,5 ml de réactif et de 0,5 ml d'échantillon à analyser est placé dans un bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Après refroidissement, la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 570 nm.

3. *Microdosage de l'azote.*

La méthode utilisée est celle de Strauch (1965). Elle comporte une minéralisation et un dosage colorimétrique par le réactif de Nessler.

4. *Déminéralisation par échange d'ions et chromatographie sur papier.*

Les fractions d'éluat provenant de la chromatographie sur Sephadex et renfermant les acides aminés libres du moût sont déminéralisées par passage sur la résine Dowex $50X_4$ (cycle H^+) dans une colonne d'une hauteur de 20 cm et d'un diamètre de 1 cm. Après rinçage de la colonne par l'eau distillée (200 à 300 ml), les acides aminés libres sont élués par 300 ml de NH_4OH (N). L'ammoniaque est éliminée par évaporation sous vide à 35-40°C et le résidu sec est repris par 1 ml d'HCl 0,1 N.

Les chromatographies sur papier ont été réalisées selon la technique utilisée par Feuillat et Bergeret (1967).

C. — *Chromatographie en phase gazeuse des acides aminés*

1. *Préparation des échantillons.*

Parallèlement à l'échantillon d'acides aminés extrait du moût (1 ml), on traite 0,5 ml d'une solution standard d'acides aminés dans HCl 0,1 N (2 mg/ml de chaque acide aminé). Seuls des acides aminés (L) sont utilisés.

L'échantillon à étudier est évaporé sous un courant d'azote dans un bloc chauffant à 60°C et en présence de 1 ml de CH_2Cl_2 qui favorise l'évaporation. On obtient en 10 à 20 minutes les acides aminés à l'état sec, sous forme de chlorhydrates.

La préparation des dérivés *n*-butyl N-trifluoroacétylés est faite selon la technique de Gehrke *et al.* (1968) qui comporte successivement une méthylation indispensable pour les acides aminés basiques, une butylation et une acylation par l'acide trifluoroacétique.

a) *Méthylation :* le résidu sec d'acides aminés est additionné de 2 ml de méthanol et l'estérification se fait à la température ambiante avec barbotage d'un courant d'HCl gazeux anhydre pendant 30 minutes.

La production d'HCl gazeux est obtenue en faisant barboter un courant d'azote dans de l'acide chlorhydrique, puis dans de l'acide sulfurique qui élimine toute trace d'humidité.

Après méthylation, l'échantillon est évaporé à sec sous un courant d'azote à 60°C.

b) *Butylation :* le résidu sec est additionné de 1 ml de butanol et de 1 ml de CH_2Cl_2 anhydre. L'interestérification se fait d'abord à la température ambiante avec barbotage d'un courant d'HCl gazeux pendant 30 minutes, puis est poursuivie en tube clos placé à l'étuve à 100°C pendant 2 heures.

L'échantillon est de nouveau évaporé à sec sous un courant d'azote à 60°C.

c) *Acylation :* le résidu sec est additionné de 0,9 ml de CH_2Cl_2 anhydre et de 0,1 ml d'acide trifluoroacétique anhydre. Le tube est bouché hermétiquement et placé à l'étuve à 150°C pendant 5 minutes.

Après refroidissement, l'échantillon est prêt pour l'analyse chromatographique.

2. *Appareillage et technique.*

L'appareil utilisé est un Packard 7400, double colonne, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme.

Les dimensions des colonnes sont de 9 pieds - 3 mm. Il s'agit :

— d'une colonne remplie sur un tiers de sa longueur en XE-60 à 1 p. 100 sur « gas chrom Q 100-120 mesh », et sur deux tiers en DEXIL-300 à 1 p. 100 sur le même support (colonne mixte) ;

— d'une colonne polaire OV-17 dont le taux d'imprégnation est de 3 p. 100 sur « gas chrom P 100-120 mesh », destinée à la séparation des acides aminés basiques.

Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 240° et 250°C. La température du four est programmée de 70 à 210°C à raison de 1°C/minute dans le cas de la colonne mixte et de 140° à 220°C dans le cas de la colonne OV-17.

La durée d'une analyse est donc de 2 heures 20 environ.

Les débits de l'air, de l'hydrogène et du gaz vecteur (azote) sont respectivement de 40 ml/minute, 400 ml/minute et 40 ml/minute.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. — *Chromatographie sur Sephadex G 25*

Cette technique a déjà été appliquée par Bergeret et Feuillat (1970) pour séparer les protéines du moût de raisin et du vin. La figure 1 rappelle que la filtration de 10 ml de moût ou de vin sur une colonne de Sephadex G 25 d'une hauteur de 45 cm donne 4 fractions principales qui absorbent dans l'UV à 278 nm.

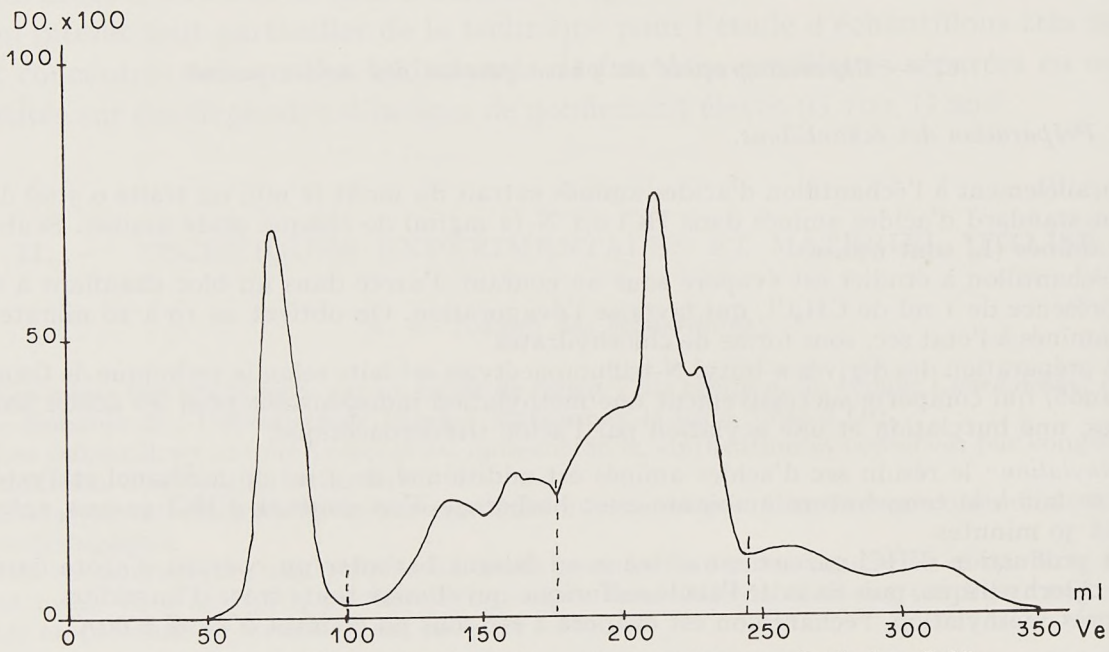


Fig. 1. — *Chromatographie du moût de raisin sur Sephadex G 25*
(colonne de 45 cm, V_0 = 72 ml)

La fraction I, dont le volume d'élution correspond au volume d'exclusion, renferme les protéines, les peptides d'un poids moléculaire supérieur à 5 000 et éventuellement des dérivés de polyosides (pectines).

La fraction IV renferme les acides aminés aromatiques et notamment le trypto-

phane, dont le retard à l'élution par chromatographie sur Sephadex est bien connu.

Les fractions II et III renferment en mélange des polyphénols qui absorbent dans l'UV, les sucres, les peptides de poids moléculaire inférieur à 5 000 et les acides aminés aliphatiques. Le tableau I montre que ce sont les deux fractions les plus riches en azote.

TABLEAU I

Teneur en azote des principales fractions d'éluat provenant de la chromatographie sur Sephadex G 25

N° de fraction	Azote (µg)
I	460
II	4 293
III	2 640
IV	210

Dans le présent travail, notre but étant de séparer avec le plus de précision possible les acides aminés libres des peptides les plus courts, nous avons préféré utiliser une colonne d'une hauteur de 100 cm.

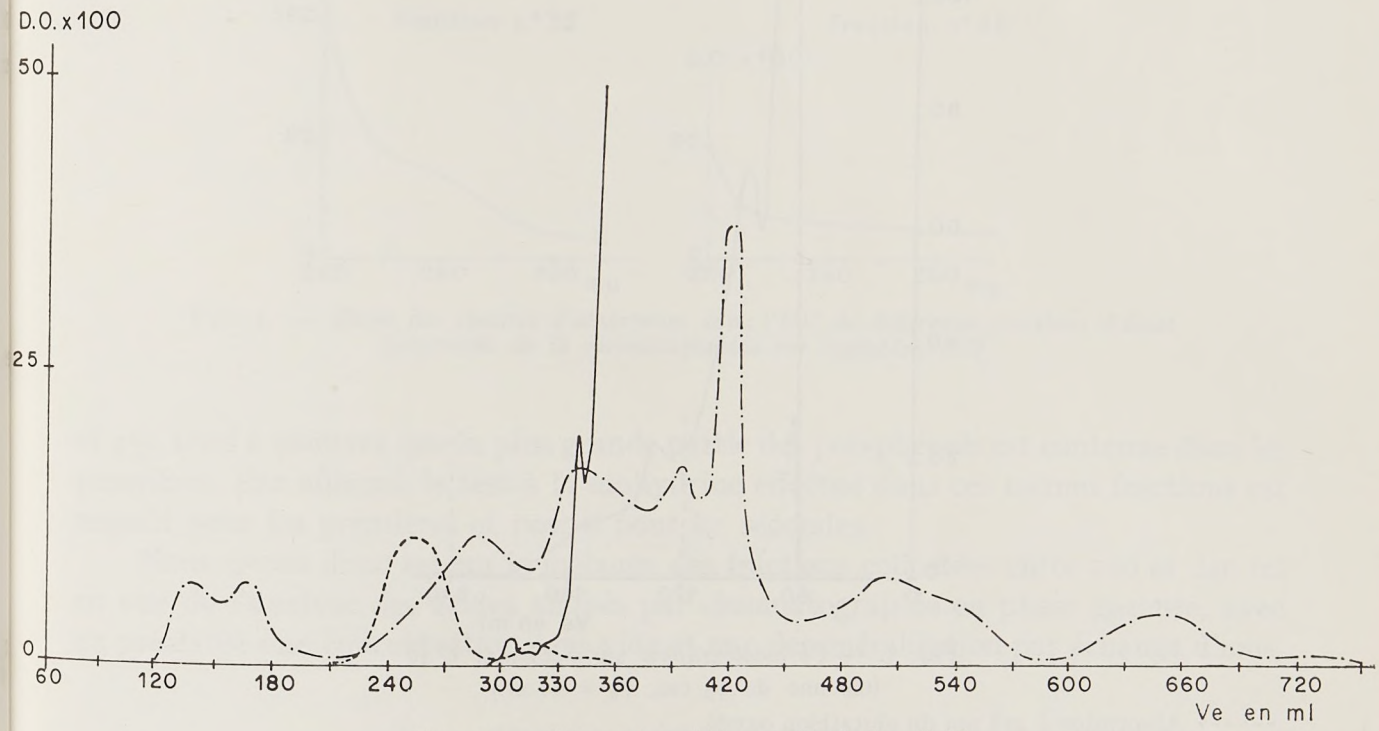


FIG. 2. — *Chromatographie sur Sephadex G 25*
(colonne de 100 cm, V_0 = 144 ml)

--------- Absorption à 278 nm du glutathion oxydé
— · — · — Absorption à 278 nm du moût de raisin
———— Absorption à 570 nm du moût de raisin après coloration à la ninhydrine

Cette colonne est préalablement étalonnée par passage d'une solution de glutathion oxydé (PM = 612) à 2 g/litre, dont l'élution est suivie par absorption dans l'UV à 278 nm. On chromatographie ensuite sur la même colonne 10 ml de moût,

dont l'élution est suivie d'une part par absorption à 278 nm, et d'autre part par coloration à la ninhydrine et mesure de l'absorption à 570 nm.

D'après la figure 2 qui regroupe les enregistrements obtenus, on constate que la coloration à la ninhydrine augmente fortement d'intensité dans les fractions correspondant à la fin de l'élution du glutathion, c'est-à-dire pour des constituants d'un poids moléculaire correspondant bien à celui des acides aminés.

La présence des acides aminés libres du moût dans la fraction d'éluat comprise entre 330 et 750 ml d'élution a d'ailleurs été confirmée par chromatographie sur papier après concentration préalable de cette fraction et déminéralisation sur échangeur d'ions.

B. — *Chromatographie sur Sephadex G 10*

La fraction d'éluat provenant de la chromatographie du moût sur Sephadex G 25, et comprise entre 330 et 750 ml d'élution, est ramenée à 10 ml par concentration sous vide, puis chromatographiée sur Sephadex G 10 (fig. 3). Cette fraction renfermant en mélange les acides aminés libres et les polyphénols du moût, le but de la chromatographie sur Sephadex G 10 est d'éliminer la plus grande partie des polyphénols avant le passage sur échangeur d'ions, dont le seul effet de purification est insuffisant.

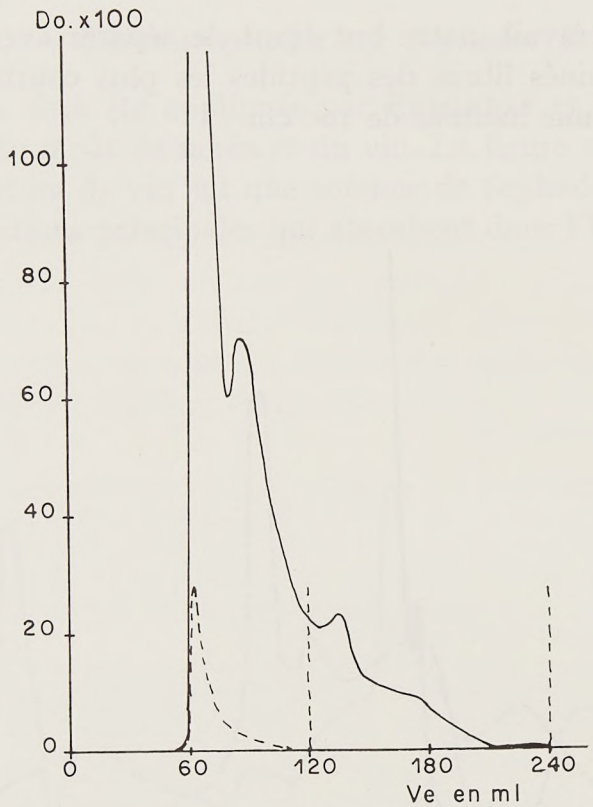


FIG. 3. — *Chromatographie sur Sephadex G 10*
(colonne de 45 cm, V_0 = 66 ml)

------ Absorption à 278 nm du glutathion oxydé
——— Absorption à 278 nm de la fraction d'éluat « G 25 » renfermant les acides aminés libres du moût

Sachant que l'élution du glutathion oxydé sur la colonne de Sephadex G 10 est terminée après l'écoulement de 120 ml de tampon (fig. 4), nous avons cherché à

savoir si, dans le volume écoulé au-delà, on retrouvait les acides aminés en l'absence de polyphénols.

L'étude des spectres d'absorption de différentes fractions d'éluat (fig. 4), les unes correspondant à un volume d'élution inférieur à 120 ml (fractions nos 30 et 35), les autres correspondant à un volume d'élution supérieur à 120 ml (fractions nos 42

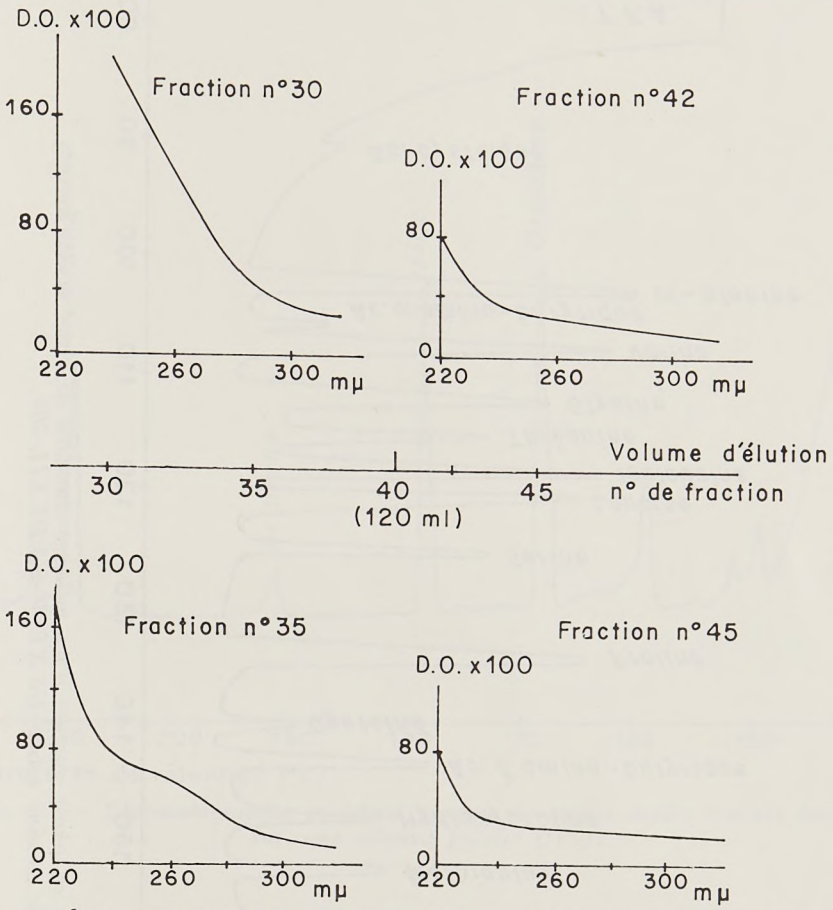


FIG. 4. — *Étude des spectres d'absorption dans l'UV de différentes fractions d'éluat provenant de la chromatographie sur Sephadex G10*

et 45), tend à prouver que la plus grande partie des polyphénols est contenue dans les premières. Par ailleurs, le test à la ninhydrine effectué dans ces mêmes fractions est négatif pour les premières et positif pour les secondes.

Nous avons donc retenu le mélange des fractions collectées entre 120 et 240 ml en vue de l'analyse des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse, avec au préalable une concentration sous vide et une déminéralisation par échange d'ions.

C. — *Chromatographie en phase gazeuse*

1. *Analyse de mélanges témoins d'acides aminés.*

Une bonne séparation des vingt acides aminés du mélange standard est obtenue sur la colonne mixte 1/3 XE-60, 2/3 DEXIL-300 (fig. 5).

Seuls interfèrent l'acide aspartique et la phénylalanine avec une vallée au demi.

Le chromatogramme présenté correspond à l'injection de 1 μg de chaque acide aminé. En réalité, compte tenu de la sensibilité de l'appareil, il est possible de détec-

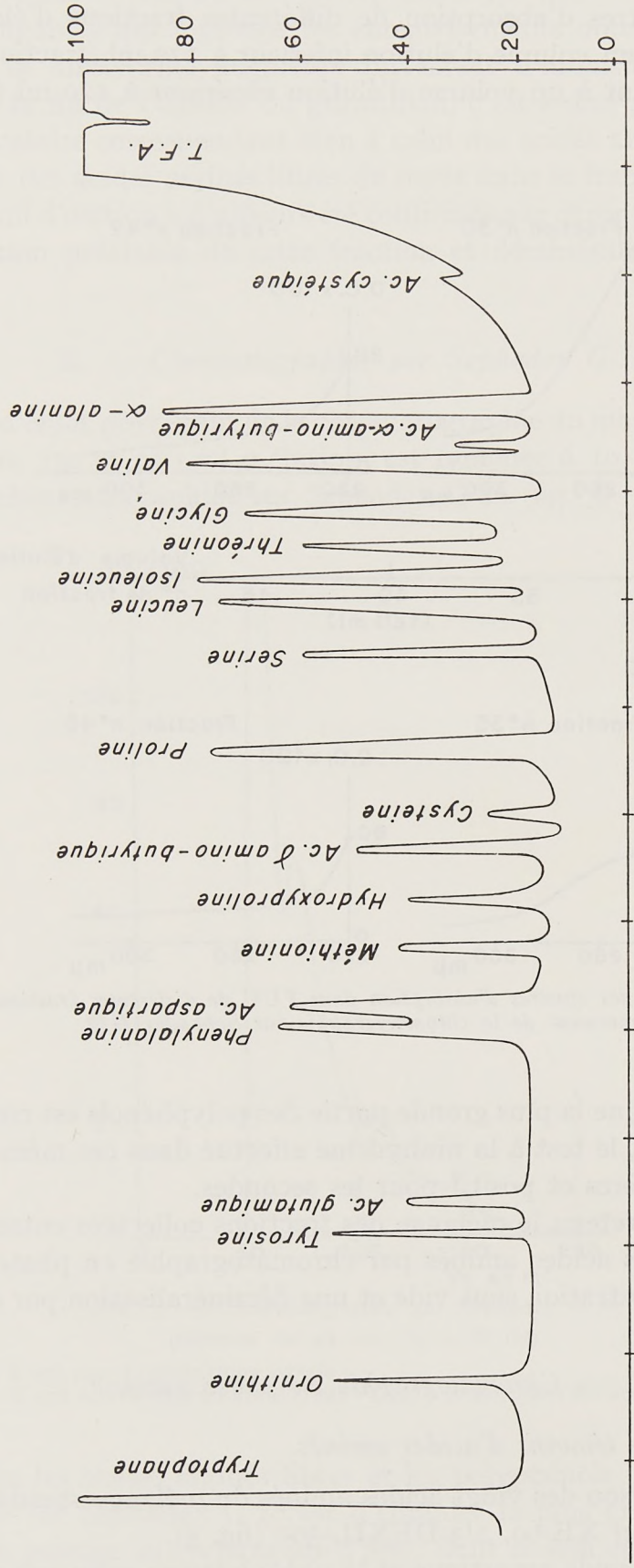


FIG. 5. — *Chromatographie en phase gazeuse d'un mélange standard de vingt acides aminés sur une colonne mixte 1/3 XE-60-2/3 DEXIL-300*

ter qualitativement des quantités de l'ordre de 0,05 µg pour le plus grand nombre des acides aminés analysés.

Seuls, l'acide cystéique, l'acide α-aminobutyrique et la cystéine ne sont détectables qu'à une quantité de l'ordre de 0,1 µg.

Les quatre acides aminés basiques étudiés sont également bien séparés sur la colonne OV-17 (fig. 6), mais l'arginine a un coefficient de réponse assez faible. Ceci

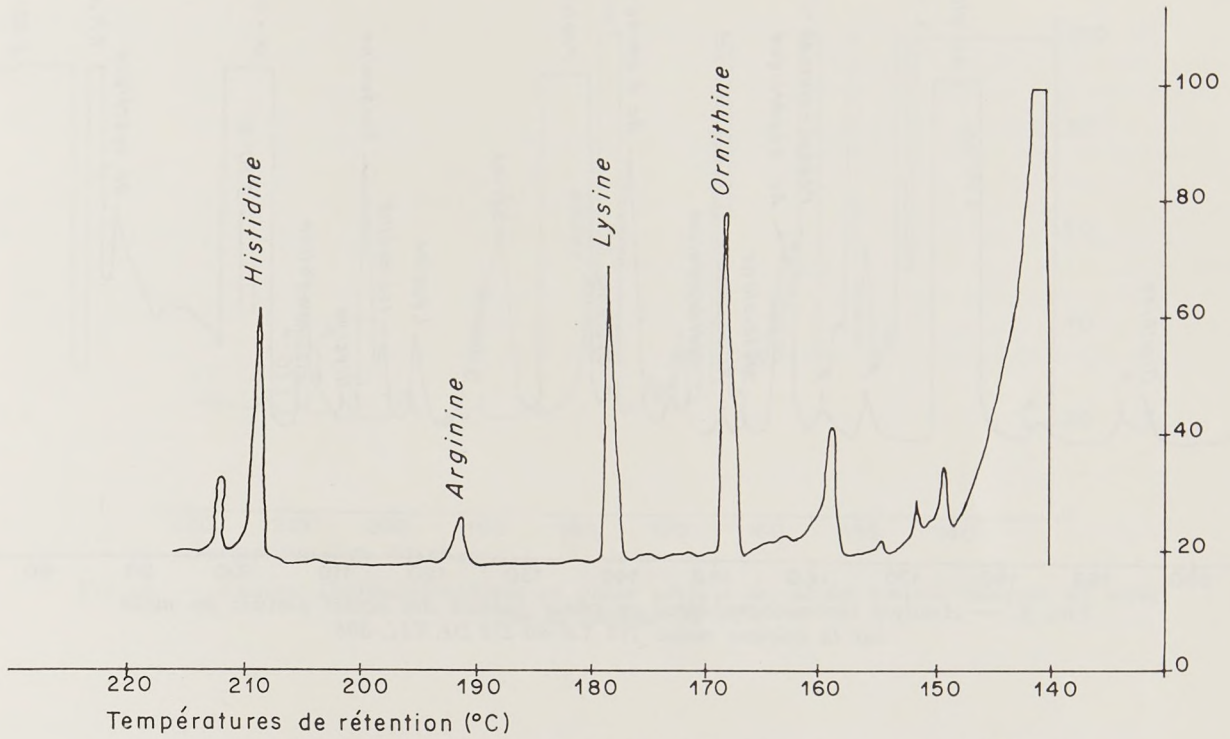


FIG. 6. — *Chromatographie en phase gazeuse de quatre acides aminés basiques sur une colonne polaire OV-17*

est peut-être à attribuer aux difficultés de préparation du dérivé de l'arginine, et plus particulièrement à la mauvaise solubilité de l'ester méthylique dans le butanol lors de l'interestérification.

2. *Analyse qualitative des acides aminés du moût de raisin.*

L'analyse qualitative des acides aminés extraits du moût a été effectuée parallèlement sur les deux colonnes.

Dix-sept acides aminés ont pu être identifiés sur le chromatogramme obtenu à l'aide de la colonne mixte (fig. 7). Les acides aminés neutres et acides dosés en fortes quantités par chromatographie sur papier (tabl. 2) tels que l'α-alanine, la sérine, la proline, l'acide γ-aminobutyrique, l'acide glutamique sont bien séparés et donnent des pics dont l'exploitation quantitative serait possible en abaissant la sensibilité de détection. Les acides aminés présents seulement à l'état de traces, tels que l'acide cystéique, la cystéine, l'hydroxyproline, la méthionine, l'ornithine, peuvent être identifiés, alors qu'ils ne le sont pas par chromatographie sur papier. Il faut noter aussi une bonne séparation de la leucine et de l'isoleucine, ce qui est assez difficile à obtenir par chromatographie sur papier.

L'analyse des acides aminés basiques du moût sur la colonne OV-17 présente

un intérêt plus limité (fig. 8). En effet, l'arginine, acide aminé basique le plus abondant du moût de raisin, a, comme sur le chromatogramme témoin, un coefficient de réponse très faible et la lysine, dont l'évolution est intéressante à suivre au cours de

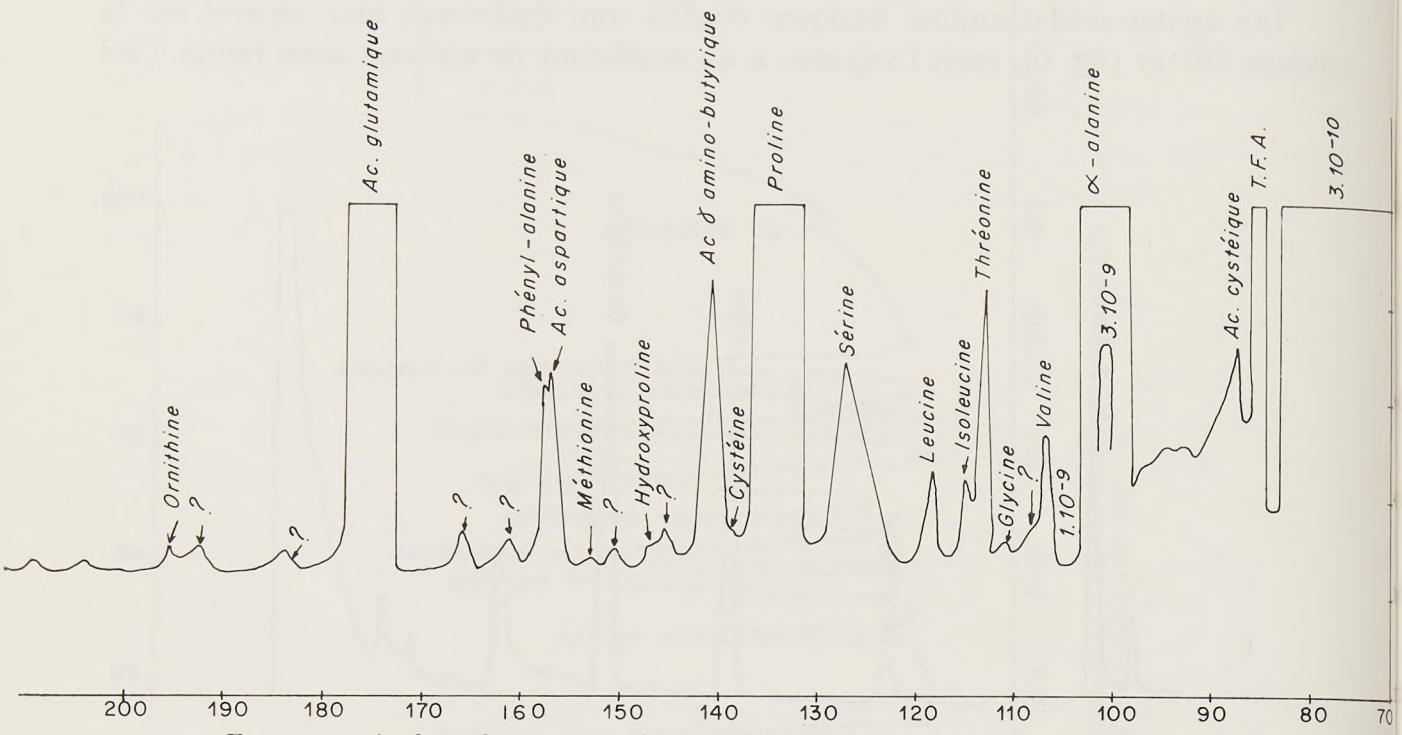


FIG. 7. — *Analyse chromatographique en phase gazeuse des acides aminés du moût sur la colonne mixte 1/3 XE-60-2/3 DEXIL-300*

TABLEAU 2

Teneur en acides aminés (N mg/l) *dosés par chromatographie sur papier*
(méthode monodimensionnelle à développements simultanés dans des solvants tamponnés)

	N (mg/l)
Arginine	52,1
α-alanine	28,6
Proline	19,1
Sérine	17,6
Acide glutamique	11,6
Acide aspartique	7,8
Acide γ-aminobutyrique	7,7
Thréonine	6,6
Tyrosine	4,2
Leucine + Isoleucine	2,5
Glycine	2,3
Valine	2,2
Lysine	traces

la fermentation alcoolique, interfère avec l'acide glutamique. L'histidine a pu être identifiée à l'état de traces et l'on retrouve l'ornithine déjà révélée par chromatographie sur la colonne mixte.

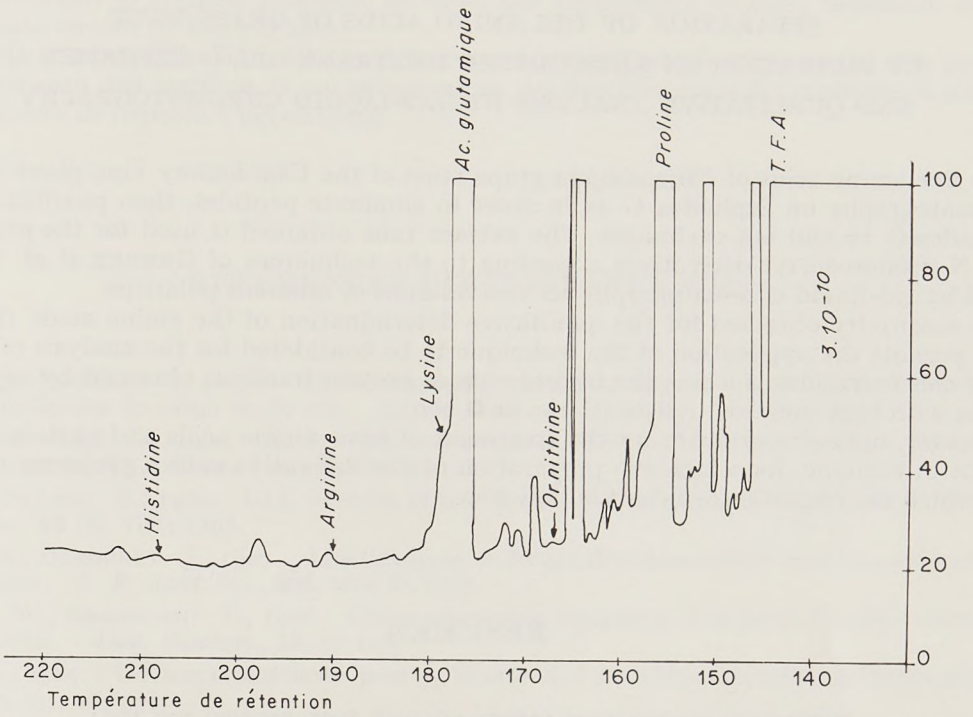


FIG. 8. — *Analyse chromatographique en phase gazeuse des acides aminés basiques du moût sur la colonne OV-17*

IV. — CONCLUSIONS

La filtration sur gel de dextrane réticulé avant passage sur échangeur d'ions permet d'isoler les acides aminés libres du moût de raisin avec un degré de purification nettement amélioré. L'élimination des peptides de faible poids moléculaire doit être en particulier aussi totale que possible, afin d'éviter leur hydrolyse au cours de la préparation des dérivés volatils, ce qui serait une cause d'erreur importante lors de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides aminés libres.

La chromatographie sur la colonne mixte 1/3 XE-60-2/3 DEXIL-300 conduit à une bonne détermination qualitative des acides aminés neutres et acides du moût et les pics pourraient être exploités quantitativement. Les acides aminés présents seulement à l'état de traces et non révélés par la chromatographie sur papier sont bien identifiés. Par contre, le dosage des acides aminés basiques, et en particulier le dosage de l'arginine, dont la préparation du dérivé pose des difficultés, nécessiterait une mise au point.

Le principal intérêt de la méthode est sa très grande sensibilité qui a été évaluée, selon la nature des acides aminés, de 0,1 à 0,05 µg. Celle-ci pourra certainement être mise à profit, comme nous l'avons dit plus haut, pour l'analyse des fractions protéiques du moût de raisin ou du vin séparables en microquantités seulement.

Reçu pour publication en septembre 1972.

SUMMARY

SEPARATION OF THE AMINO ACIDS OF GRAPE MUST BY FILTRATION ON RETICULATED DEXTRANE GEL (« SEPHADEX ») AND QUALITATIVE ANALYSIS BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

The free amino acids of *Vitis vinifera* grape must of the *Chardonnay* vine-plant are isolated by chromatography on Sephadex G 25 in order to eliminate peptides, then purified by passage on Sephadex G 10 and ion exchanger. The extract thus obtained is used for the preparation of *n*-butyl N-trifluoroacetyl derivatives according to the techniques of GEHRKE *et al.* (1968), then analyzed by gas-liquid chromatography on two columns of different polarities.

The sensitivity obtained for the qualitative determination of the amino acids (from 0,1 to 0,05 μg) permits the application of the technique to be considered for the analysis of samples of very low concentrations, such as the hydrolysats of protein fractions obtained by separation on Sephadex with high inflation indices (G 100 or G 200).

However, difficulties remain for the treatment of basic amino acids and particularly for the treatment of arginine, for which the preparation of the derivative causes problems of solubility and for which the response coefficient is very low.

RESUMEN

SEPARACION DE LOS AMINOACIDOS DEL MOSTO DE UVA POR FILTRATION SOBRE GEL DE DEXTRANO RETICULADO (« SEPHADEX ») Y ANALYSIS CUALITATIVO MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA

Los aminoácidos libres de un mosto de uva de *Vitis vinifera*, variedad *Chardonnay*, son aislados por cromatigrafía sobre Sephadex G 25, con objeto de eliminar los péptidos, procediéndose acto seguido a purificación por paso sobre Sephadex G 10 y sobre intercambiador de iones. El extracto así obtenido es utilizable para la preparación de derivados *n*-butilo N-trifluoroacetilados según la técnica de GEHRKE *et al.* (1968), y acto seguido, sometido a anàlisis por cromatografía en fase gaseosa en dos columnas de polaridades diferentes.

La sensibilidad obtenida para la determinación de los aminoácidos desde el punto de vista cualitativo (de 0,1 a 0,05 μg) permite considerar la aplicación de la técnica al análisis de muestras muy poco concentradas, como por ejemplo los hidrolstatos de fracciones proteicas obtenidas por separación sobre Sephadex de índices de expansión elevados (G 100 ó G 200).

No obstante, aún existen algunas dificultades para el tratamiento de los aminoácidos básicos, y en particular para el tratamiento de la arginina, cuya preparación del derivado plantea problema de solubilidad y cuyo coeficiente de respuesta en sumamente reducido.

RIASSUNTO

SEPARAZIONE DEGLI AMMINOACIDI DEL MOSTO D'UVA MEDIANTE FILTRAZIONE SU GELO DI DESTRANO RETICOLATO (« SEPHADEX ») E ANALISI QUALITATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFIA IN FASE GASSOSA

Gli amminoacidi liberati da un mosto d'uva di *Vitis vinifera*. vitigno *Chardonnay*, sono isolato mediante cromatografia su Sephadex G 25 per eliminare i peptidi, poi purificati tramite passaggio su Sephadex G 10 e su scambiatori di ioni. L'estratto cosi ottenuto viene utilizzato

per la preparazione di derivati *n*-butile N-trifluoroacetilati secondo la tecnica di GEHRKE *et al.* (1968) poi sottoposti all'analisi mediante cromatografia in fase gassosa su due colonne di polarità diverse.

La sensibilità ottenuta per la determinazione qualitativa degli amminoacidi (da 0,1 a 0,05 µg) permette di prevedere l'applicazione della tecnica all'analisi di campioni molto poco concentrati quali gli idrolizzati di frazioni proteiche ottenute per separazione su degli Sephadex con indici di gonfiamento elevati (G 100 o G 200).

Tuttavia restano delle difficoltà per il trattamento degli amminoacidi basici e in particolare per il trattamento dell'arginine, la cui preparazione del derivato pone dei problemi di solubilità e il cui coefficiente di risposta è debolissimo.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGERET J., FEUILLAT M., 1970. Chromatographie sur gel ou « tamisage moléculaire ». Moyen d'étude des macromolécules du raisin ou du vin. *Rev. fr. Œnol.*, (39), 5-14.

CAMPOS L., SEVERIN M., 1970. Analyse des acides aminés libres du vin par chromatographie en phase gazeuse (en portugais). *Vinea Vino*, **5**, série II (2).

FERNANDEZ-FLORES E., 1970. GLC analysis of free amino acids in fruits and fruit juices. *J. Ass. off. anal. Chem.*, **53** (6), 1203-1208.

FEUILLAT M., BERGERET J., 1967. Identification et dosage des aminoacides dans les moûts et les vins de Bourgogne. *C. R. Acad. Sci.*, **264**, série D, 1757.

GEHRKE G. W., SHAHROKHI F., 1966. Chromatographic separation of *n*-butyl N-trifluoroacetyl esters of amino acids. *Anal. Biochem.*, **15**, 97-108.

STRAUCH L., 1965. Ultra-microméthode pour le dosage de l'azote dans les substances biologiques. *Z. klin. Chem.* (5), 165-167.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (2), 145-161.

ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA « MATURATION » DES FARINES DE BLÉ. INFLUENCE DE L'AÉRATION SUR L'ÉVOLUTION DE DIVERSES CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES (1)

P. BELLENGER et B. GODON

Laboratoire de Contrôle et de Technologie des Blés, I. N. R. A.,
École nationale supérieure de Meunerie et des Industries céréalières,
16, rue Nicolas Fortin
75013 Paris

RÉSUMÉ

Une étude comparative de la maturation des farines de blé (variété *Capitole*) a été réalisée en atmosphère aérée et en atmosphère confinée pour suivre l'influence de l'aération sur certaines des propriétés biochimiques et physico-chimiques, indépendamment de tout développement microbiologique. Les farines ont été étudiées au cours du stockage pendant seize semaines, du point de vue des variations de la teneur en acides gras, de l'évolution des pigments, de certaines caractéristiques du gluten et de sa teneur en liaisons disulfures et groupes sulfhydriles.

Les farines stockées en milieu aéré présentent des modifications des propriétés étudiées beaucoup plus importantes que les lots placés en milieu confiné : forte augmentation du W de l'alvéogramme, croissance de l'acidité grasse au début du stockage par suite de la lipolyse, puis diminution lente sous l'action de la lipoxygénase, décoloration des caroténoïdes, apparition de produits d'oxydation des acides gras, diminution de la teneur des acides linoléique et linolénique, réduction des liaisons S—S.

Cette étude a permis de relier les variations des propriétés rhéologiques aux modifications de certains des constituants étudiés.

Mots clés : *blé, farine, stockage, maturation, aération, protéines, acides gras, caroténoïdes.*

I. — INTRODUCTION

Une période de quelques semaines sépare habituellement la mouture industrielle de l'utilisation des farines ; durant ce stockage voulu ou plus généralement imposé, diverses modifications biochimiques et physico-chimiques, souvent favo-

(1) Une partie de ce travail a été réalisée pour l'obtention d'un D. E. A. de Physiologie végétale appliquée par P. BELLENGER à la Faculté des Sciences de Paris (1971).

rables, se produisent. L'ensemble de ces phénomènes mal connus est ordinairement appelé « maturation ». Il en résulte des problèmes techniques et économiques importants qui se posent de plus en plus avec les nouvelles conditions d'échanges et d'exportation.

En effet, d'une part les moulins doivent posséder des silos plus importants et, d'autre part, la surveillance doit être plus sévère car la farine formée de cellules végétales fortement endommagées est un matériel beaucoup plus sensible aux contaminations microbiennes que les grains.

Ainsi, la connaissance des conditions de stockage les plus favorables présente un intérêt tout particulier pour le technologue et l'industriel céréalier.

De nombreux auteurs ont étudié l'évolution des constituants des farines au cours du stockage ; on connaît depuis très longtemps l'action bénéfique de la « maturation » qui se traduit généralement par une augmentation de la pression de l'alvéographe Chopin et une diminution du gonflement, parallèlement à une diminution du pH (Loeb, 1930).

Évidemment, des phénomènes microbiologiques peuvent venir se superposer aux phénomènes chimiques si les conditions de température et d'hydratation sont favorables. Mais Poisson et Guilbot (1957) ont montré qu'une farine ayant une teneur en eau inférieure à 14-15 p. 100 peut être conservée en dessous de 45°C sans que la microflore puisse se développer et provoquer d'altération. De plus, Poisson, Bègue et Bourbon (1957) ont observé que la zone de stabilité technologique est plus étroite que la zone de stabilité bactériologique. En étudiant la conservation des farines de 12,4 à 15,4 p. 100 d'hydratation, stockées à différentes températures, ces auteurs montrent que malgré l'absence de développement microbien les modifications de l'alvéogramme Chopin qui apparaissent sont d'autant plus rapides que la température et la teneur en eau sont plus élevées. Au début, on note une amélioration de la valeur du W et de l'équilibre ténacité-élasticité. Puis, après une période variable avec les conditions de stockage, les farines perdent progressivement leur élasticité tandis que la ténacité s'accroît de façon importante.

Le rôle essentiel de l'oxygène dans l'évolution des caractéristiques des farines a été montré depuis longtemps. Après diverses études sur l'influence des conditions de stockage, reprises dans une mise au point faite par Cathcart et Killen (1939), mais difficilement utilisable maintenant, des travaux récents ont de nouveau montré que l'utilisation d'un milieu aéré peut provoquer une accélération importante de la maturation (Sosedov, 1967 ; Daniels *et al.*, 1969). On peut aussi arrêter toute maturation en ayant recours à une atmosphère d'azote (Yoneyama, Suzuki et Murohashi, 1970).

L'attention des premiers auteurs avait été attirée sur le fait que les modifications des caractéristiques des farines d'origine non microbiologique se manifestent principalement par une augmentation de l'acidité aux dépens de la matière grasse, accompagnant l'amélioration de la valeur boulangère (Balland, 1904 ; Caubet, 1910). On sait maintenant que cette acidité est due à l'apparition d'acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides, essentiellement, sous l'action des lipases. Ces enzymes peuvent agir dans un milieu même peu hydraté, comme la farine, en raison vraisemblablement de l'état liquide du substrat (Drapron et Uzzan, 1968).

Estimant cependant improbable que l'accroissement de l'acidité soit le seul facteur responsable de l'évolution rhéologique des farines, Bailey (1925) a émis

une hypothèse relative à l'oxydation des lipides par voie enzymatique. Plus tard, MECHAM et PENCE (1957) suggèrent une oxydation des acides gras par l'intervention d'une lipoxygénase, oxydation qui se produit de manière concomitante de la décoloration des pigments.

Quel que soit le mécanisme exact de l'oxydation des acides gras, le fait important réside dans leur action sur les propriétés des protéines du gluten. Pour certains auteurs, les acides gras insaturés produisent une amélioration des propriétés du gluten (KOZMIN, 1935), pour d'autres cette action est néfaste (BARTON-WRIGHT, 1938). Ces divergences proviennent certainement des conditions différentes de l'expérimentation. A la lumière d'un certain nombre de travaux (GUILLEMET, 1943 ; BARKER, PARKER et MIZE, 1944), il apparaît que ces oxydations affectent en particulier les liaisons sulfhydriles des protéines.

Les études effectuées sur l'oxydation des constituants des pâtes peuvent, peut-être, nous suggérer certaines hypothèses dans le cas des farines, bien que les analogies soient limitées à cause de la grande différence d'hydratation. TSEN et HLYNKA (1962) remarquent que, dans les pâtes, les lipides sont en compétition pour l'oxygène avec les groupes SH ; ils pensent que les lipides oxydés oxydent à leur tour les groupes sulfhydriles et exercent ainsi un effet améliorant. Ce mécanisme se retrouverait pour tous les peroxydes dont l'effet « maturant » pourrait être attribué à leur action oxydante sur les groupes SH (TSEN et HLYNKA, 1963). En partant de ces observations, ces auteurs ont présenté et discuté un schéma illustrant une hypothèse générale sur le rôle des lipides dans l'oxydation des constituants des pâtes. Celle-ci est basée sur le fait que les lipoperoxydes pourraient jouer un rôle d'intermédiaire dans l'oxydation des SH du gluten. Cette hypothèse peut être séduisante, mais de nombreux points restent à préciser. Elle a été quelque peu confirmée par les résultats de SULLIVAN, DAHLE et SCHIPKE (1963) et de BURÉ et GAY (1964) qui ont étudié le rôle de diverses fractions lipidiques dans la valeur boulangère. Cette oxydation des groupes sulfhydriles permet, en effet, d'expliquer l'évolution des propriétés rhéologiques du gluten. Car on sait que ces dernières sont reliées aux taux des groupes sulfhydriles et des liaisons disulfures, c'est-à-dire au rapport S—S/SH (KUCHUMOVA et STRELNIKOVA, 1967) ou, ce qui revient au même, aux échanges entre les S—S et les SH (KUNINORI et SULLIVAN, 1968).

Mais il semble que le processus responsable des modifications des groupes SH dans les farines soit plus complexe qu'une simple oxydation par l'intermédiaire des acides gras. Car CUENDET *et al.* (1954) notent une relation inverse entre la quantité d'acides gras et le volume du pain sans pouvoir fixer exactement le degré de rancissement de ces acides. Ils en arrivent à la conclusion que la fraction lipidique n'est pas seule en cause et que les modifications biochimiques des autres constituants doivent être prises en considération.

Déjà HLYNKA (1949) puis HLYNKA et BASS (1949) avaient suggéré la possibilité de réactions entre les protéines et les glucides de la farine au cours de la « maturation ». PRATT (1957) signale une diminution de la teneur en maltose au cours du stockage. Mais il faut remarquer que les variations de teneurs en maltose semblent surtout dues à l'activité microbienne. Ainsi, GRACZA (1965) observe que des farines stockées à 9 p. 100 d'humidité relative dans des containers scellés, à des températures comprises entre 24 et 32°C, ne présentent pas de variations de leur teneur en maltose pendant cinquante et une semaines, contrairement aux farines stockées en sac de

coton en atmosphère très humide (58 à 90 p. 100), c'est-à-dire dans des conditions favorables au développement des micro-organismes.

Si les réactions en jeu paraissent se ramener essentiellement à des oxydations et des réductions, nous avons pu voir qu'il est difficile d'en préciser dans le détail le mécanisme à partir de cet ensemble de résultats parfois contradictoires, ceux-ci ayant été obtenus dans des conditions beaucoup trop variées. De plus, la majorité de ces études a porté sur des blés étrangers, très souvent américains, qui diffèrent notablement des blés français par la valeur plus élevée de leur force boulangère, de leur teneur en protéines (14 p. 100 contre 12 p. 100) et de leur taux de lipides (3 p. 100 contre 1,7 p. 100).

En nous plaçant dans des conditions empêchant l'action des micro-organismes, nous avons comparé les modifications des protéines du gluten, des acides gras et des pigments caroténoïdes d'une farine selon qu'elle est plus ou moins aérée.

Nous avons voulu ainsi orienter notre travail vers des points qui n'ont à peu près pas été abordés par les autres auteurs, à savoir :

— l'influence des conditions d'aération sur les modifications physico-chimiques de certains constituants des farines,
— l'évolution de structure du gluten,
— les variations de la teneur en acides gras.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Matériel végétal*

Nous avons utilisé du blé *Triticum vulgare*, variété *Capitole*, récolté en 1970. La farine a été préparée au moulin Buhler avec un rendement de 72 p. 100. Elle possède des caractéristiques proches de celles de la farine industrielle.

B. — *Modes de stockage*

Le stock de farine a été séparé en plusieurs lots maintenus à 20°C et à une teneur en eau de 13,8 p. 100. Les analyses ont été effectuées après des temps de stockage variant de 0 à 16 semaines. Une partie des échantillons a été placée dans des sacs en toile permettant un stockage en atmosphère aérée, l'autre partie dans des bocaux en polyéthylène hermétiquement clos, réalisant ainsi un stockage en atmosphère confinée (le polyéthylène, partiellement perméable à certains composés gazeux, ne peut guère permettre un renouvellement important de l'atmosphère).

Nous appellerons farines A celles maintenues en milieu aéré et C celles stockées en atmosphère confinée. Nous avons repéré les lots par t_0 à t_{16} selon le nombre de semaines de stockage. Tous ces essais ont été effectués en double, simultanément.

C. — *Méthodes analytiques*

1. *Contrôle microbiologique.*

Nous avons dénombré, pour chaque échantillon, les bactéries, les moisissures et les levures. Pour ce faire, les micro-organismes des farines sont mis en suspension par agitation dans un milieu aqueux de pH 7 contenant du chlorure de sodium (9 p. 100), de la bactopeptone (1 p. 100) et du Tween 80 (0,033 p. 100). Ils sont dénombrés selon la méthode de dilution centésimale après ensemencement de milieux de culture appropriés. Ces milieux utilisés pour révéler au mieux les diffé-

rentes composantes floristiques des farines figurent parmi ceux qui sont employés en technologie alimentaire (Buttiaux, 1968), en microbiologie des sols (Pochon, 1958) et en microbiologie générale (Cassagne, 1961).

Les bactéries mésophiles sont cultivées sur le milieu « gélose-numération » additionné d'actidione et dénombrées après 48 heures en anaérobiose à 30°C.

Les bactéries anaérobies sont dénombrées sur le milieu « viande-levure » après 48 heures en anaérobiose à 30°C.

Les moisissures sont dénombrées après 5 jours à 24°C sur les milieux Czapek et malt additionnés d'antibiotiques.

Les levures sont dénombrées sur « gélose-numération » additionnée de streptomycine et de pénicilline, après 48 heures à 24°C.

2. *Propriétés rhéologiques.*

La force boulangère des lots de farines a été testée en utilisant l'alvéographe (Chopin, 1921). Le principe de l'alvéographe Chopin est de suivre la déformation d'une mince lame de pâte par suite de l'action d'une pression d'air insufflé à vitesse constante, par analogie avec la formation des alvéoles au cours de la panification. On enregistre la pression à l'intérieur de l'alvéole en fonction du volume d'air insufflé. Dans un premier temps, la pression augmente rapidement jusqu'à un maximum P, qui représente la ténacité de la pâte. La pâte s'étire ensuite en formant une alvéole dont le volume s'accroît jusqu'à ce que le gonflement maximal G soit atteint et que la rupture de l'alvéole intervienne. Le travail de déformation de la pâte W, qui tient compte de la ténacité, de l'extensibilité et de la surface de l'alvéogramme, est considéré comme une expression de la force boulangère.

3. *Caractéristiques physico-chimiques du gluten.*

Pour caractériser les propriétés physico-chimiques du gluten, nous avons étudié l'évolution de sa solubilité dans l'acide acétique 0,01 N et la répartition chromatographique sur gel de dextrane Sephadex G-100 de ses constituants protéiques solubilisés. Le gluten est extrait par lixiviation à l'eau de ville à partir d'un pâton hydraté à 52 p. 100. Sa solubilité est déterminée en partant du gluten humide, par agitation dans l'acide acétique pendant 60 heures à 4°C. Le surnageant, récupéré par centrifugation (8 000 *g* à température ambiante pendant 20 minutes) subit un fractionnement sur gel. Pour ce faire, nous avons recours à une élution par changement de solvants (eau, acide acétique 0,02 N, ammoniaque 0,02 N) selon la technique mise au point par l'un de nous (Godon, 1969), de façon à récupérer la totalité des substances déposées ; ainsi pour chaque lot de farine nous avons obtenu les pourcentages P_0, P_1, P_2, P_3 et P_4 respectivement du gluten insoluble F_0 et des fractions F_1, F_2, F_3 et F_4 de la partie dispersable dans l'acide acétique.

4. *Dosage des groupes soufrés.*

Nous avons dosé les groupes sulfhydriles par la méthode ampérométrique de Benesch et Benesch (1952) que nous avons décrite plus récemment. Celle-ci utilise la réaction de ces groupes avec le chlorure d'éthylmercure. A l'aide d'une électrode indicatrice à goutte de mercure et d'une électrode de référence en platine maintenues à une différence de potentiel de 0,3 volt, il est possible de déterminer la teneur en micro-équivalents de groupes sulfhydriles par mg de farine sèche ; elle correspond au point anguleux de la courbe obtenue en portant les variations d'intensité du courant en fonction du volume de la solution de chlorure d'éthylmercure $2 \cdot 10^{-3}$M ajouté. On a ainsi dosé directement les groupes sulfhydriles libres puis, après sulfitolyse, les groupes sulfhydriles totaux (SH libres + SH formés par réduction des groupements S—S) et par différence on a calculé la quantité de liaisons disulfures.

5. *Préparation et analyse des acides gras libres.*

La préparation et l'analyse des acides gras libres utilise une méthode adaptée de celle que Drapron et Sclafani (1969) ont proposée pour déterminer l'activité lipolytique des produits solides et pâteux.

Les lipides sont extraits à la température du laboratoire par l'hexane dans un appareil de Soxhlet pendant 6 heures. Après avoir ajouté à cet extrait lipidique une quantité connue d'acide margarique en guise d'étalon interne, une partie aliquote de cet extrait est déposée sur une couche mince de kieselgel, et la chromatographie s'effectue à l'aide d'un éluant peu polaire (hexane, oxyde diéthylique, acide formique, 60/39/1, v/v/v). La partie de la couche mince conte-

nant les acides gras libres est récupérée ; les acides gras sont élués puis transformés en esters méthyliques par le diazométhane selon la méthode de SHLENK et GELLERMAN (1960). Une partie aliquote de la solution des esters méthyliques d'acides gras est soumise à une chromatographie en phase gazeuse en utilisant un chromatographe Aerograph type 204-1 B équipé d'une colonne (10′, 1/8″) remplie de chromosorb W 60-80 AW imprégné de 10 p. 100 de succinate de diéthylène glycol, et muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Le gaz vecteur est l'azote.

La résolution est excellente ; l'acide margarique n'interfère avec aucun des constituants. L'aire des pics correspondant aux différents acides gras est mesurée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la teneur des acides gras totaux et sont reproductibles à 15 p. 100 près. La teneur totale en acide gras est exprimée en mg d'acide oléique pour 100 g de farine.

6. *Évolution des produits d'oxydation des acides gras insaturés.*

L'évolution des produits issus de l'oxydation des acides gras est suivie par spectrophotométrie ultraviolette après extraction à froid par le cyclohexane selon la méthode indiquée par WOLF (1968). Leur extraction se fait à partir de 5 g de farine par agitation manuelle pendant 15 minutes dans 20 ml de cyclohexane purifié, suivie d'une centrifugation. Le spectre d'absorption du surnageant entre 220 et 340 nm permet de détecter l'apparition des produits d'oxydation primaire et secondaire des acides gras.

7. *Évolution des pigments caroténoïdes.*

Le spectre d'absorption, entre 400 et 500 nm, du surnageant obtenu par la même extraction dans le cyclohexane permet de suivre la disparition des pigments caroténoïdes.

III. — RÉSULTATS

1. — *Contrôle microbiologique*

Les résultats du contrôle microbiologique (tabl. 1) montrent que le nombre des micro-organismes des farines A et C varie très peu tout au long du stockage. Dans la plupart des cas, les faibles variations observées, dans la mesure où elles sont

TABLEAU I

Dénombrement des micro-organismes des différents échantillons de farine

Échantillons et temps (en semaines)	Milliers de micro-organismes par gramme de matière fraîche				
	Bactéries		Levures	Moisissures	Total
	Aérobies et anaérobies facultatives	Anaérobies			
t_0 : C et A	13	5	—	8,82	26,82
t_1 C	15	4,25	0,58	3,75	23,58
t_1 A	13,8	5,47	0,1	2,37	21,74
t_4 C	14,7	1,8	0,37	3,5	20,37
t_4 A	16	—	0,1	2,35	18,45
t_{13} C	6,6	3,3	0,16	0,12	10,19
t_{13} A	5,7	2,35	0,2	1,0	9,25

significatives, vont dans le sens d'une diminution. De plus, il n'y a pas de différence sensible de l'évolution en fonction des conditions de stockage utilisées. On peut donc affirmer que les différences biochimiques ou physico-chimiques mises en évidence par ailleurs ne sont pas dues à une évolution différente des micro-organismes.

2. — *Propriétés rhéologiques*

Les résultats portés sur les courbes des figures 1, 2 et 3 mettent en évidence une évolution des caractéristiques rhéologiques, différente selon les conditions d'aération.

Ainsi, le gonflement G ne présente pas de variations significatives dans le cas des farines C, hormis une légère augmentation durant la première semaine. Au contraire, dans le cas des farines aérées, G passe par un maximum au bout de deux semaines de stockage, puis diminue ensuite très sensiblement (fig. 1).

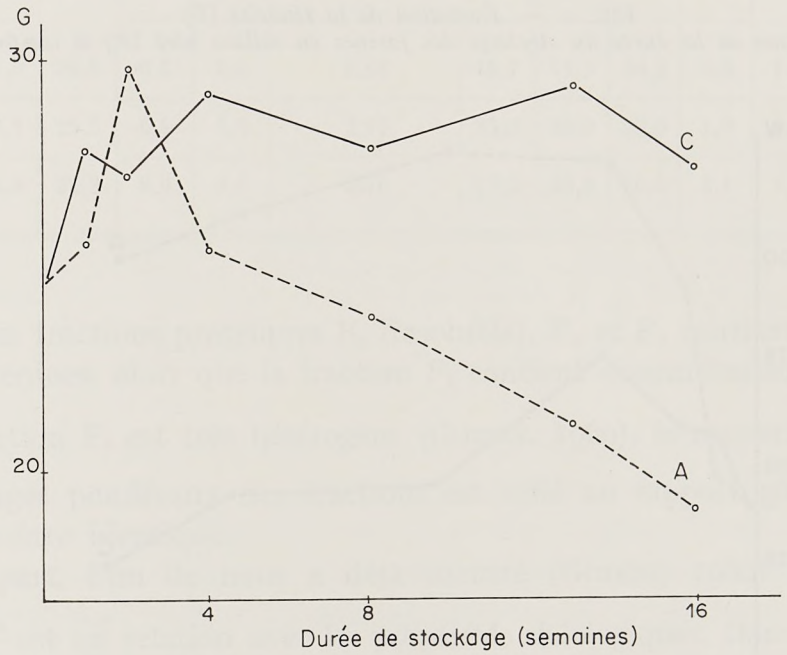


FIG. 1. — *Évolution du gonflement* (G) *en fonction de la durée du stockage des farines en milieu aéré* (A) *et confiné* (C)

De même, la ténacité P ne varie pas significativement au cours du stockage des farines C alors qu'elle augmente d'une manière très importante à partir de la troisième semaine de stockage en atmosphère aérée (fig. 2).

La force boulangère W varie assez faiblement et passe par un maximum après quatre semaines en ce qui concerne les farines C, alors que dans les conditions de stockage aéré la force croît d'une manière très importante pendant les quatre premières semaines puis décroît lentement à partir de huit semaines de stockage (fig. 3).

Ainsi toutes les caractéristiques rhéologiques évoluent très nettement pour les farines A, alors que les farines C présentent une évolution faible de la force boulangère et aucune variation significative des autres caractéristiques rhéologiques après la stabilisation du gonflement au cours de la première semaine.

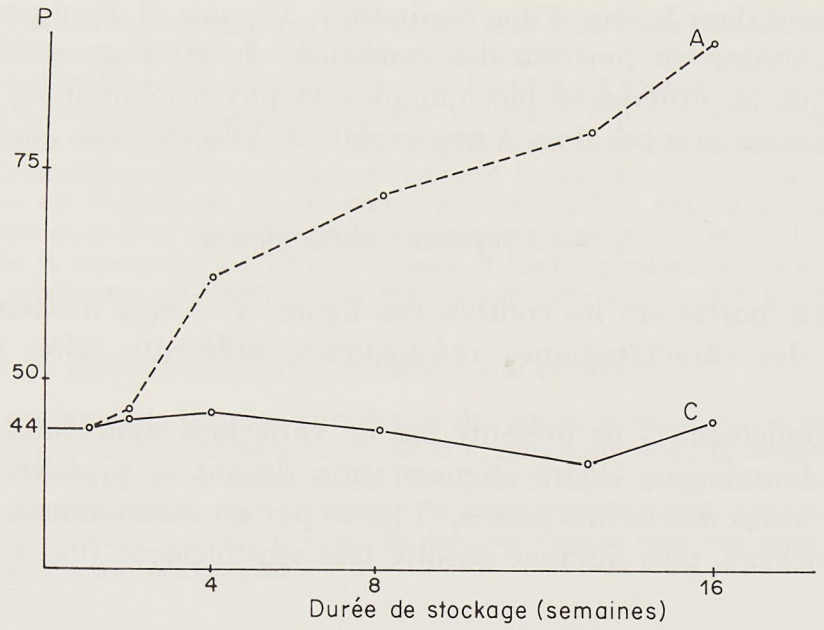


FIG. 2. — *Évolution de la ténacité* (P)
en fonction de la durée du stockage des farines en milieu aéré (A) *et confiné* (C)

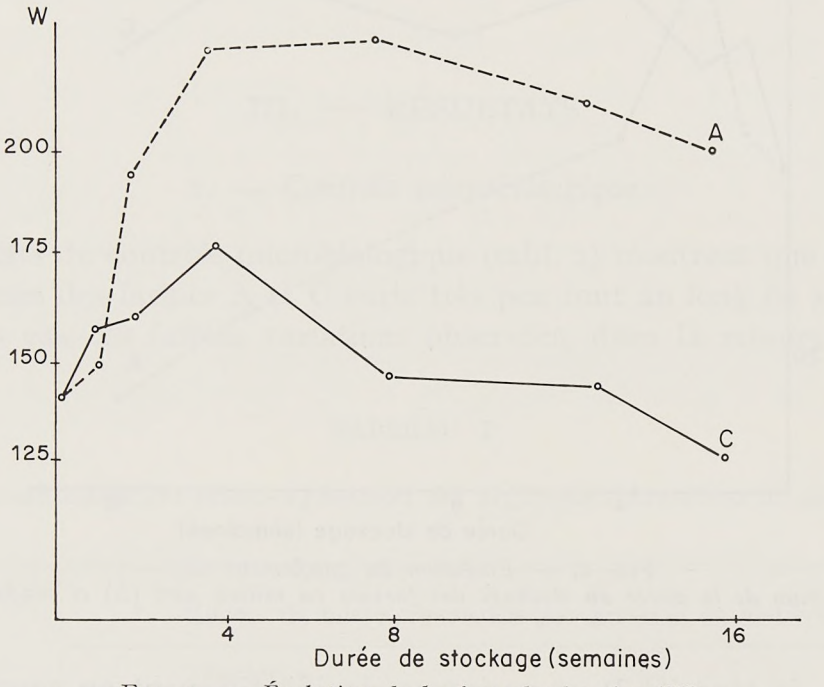


FIG. 3. — *Évolution de la force boulangère* (W)
en fonction de la durée du stockage des farines en milieu aéré (A) *et confiné* (C)

3. — *Caractéristiques physico-chimiques du gluten*

Le tableau 2 indique les valeurs du pourcentage P_0 du gluten insoluble dans l'acide acétique et celles de P_1, P_2, P_3 et P_4 des fractions chromatographiques du soluble après huit et treize semaines de stockage.

Nous avons ainsi observé que :

— dans tous les lots de farine, l'insolubilité du gluten dans l'acide acétique 0,01 N augmente au cours du stockage ; cette augmentation de la fraction P_0 apparaît cependant plus rapide dans le cas d'un stockage en atmosphère aérée ;

— les valeurs de P_1 sont très proches dans les deux types de stockage et elles diminuent de façon comparable entre huit et treize semaines ;
— de même, les valeurs de P_2 diminuent sensiblement au cours du stockage ; ces valeurs sont plus faibles dans le cas de l'atmosphère aérée ;
— les valeurs de P_3 et P_4 augmentent, celles de P_3 sont plus faibles pour la farine aérée, alors que celles de P_4 sont voisines pour les farines C et A.

TABLEAU 2

Répartition chromatographique des protéines du gluten

Échantillons	Farine non aérée						Farine aérée					
	P_0 p. 100	P_1 p. 100	P_2 p. 100	P_3 p. 100	P_4 p. 100	$\frac{P_0 + P_1 + P_4}{P_2}$	P_0 p. 100	P_1 p. 100	P_2 p. 100	P_3 p. 100	P_4 p. 100	$\frac{P_0 + P_1 + P_4}{P_2}$
t_0	15,7	41,5	35,2	6 2	1,4	1,66	15,7	41,5	35,2	6,2	1,4	1,66
t_8	24,0	39,1	29,5	6,4	1,0	2,17	35,0	38,0	23,6	1,9	1,4	3,14
t_{13}	31,9	32,8	24,3	8,0	3,0	2,70	47,4	30,8	16,6	3,1	2,0	4,82

Comme les fractions protéiques F_0 (insoluble), F_1 et F_4 contiennent principalement des gluténines, alors que la fraction F_2 contient essentiellement des gliadines et que la fraction F_3 est très hétérogène (Godon, 1969), le rapport $\frac{P_0 + P_1 + P_4}{P_2}$ des pourcentages pondéraux des fractions est relié au rapport gluténine/gliadine sans toutefois être identique.

D'autre part, l'un de nous a déjà montré (Godon, 1969) que le rapport $\frac{P_0 + P_1 + P_4}{P_2}$ est en relation avec les propriétés rhéologiques. Dans le cas présent, ce rapport est plus grand pour les échantillons de farines aérées que pour les autres, ce qui correspond bien à des valeurs des paramètres rhéologiques W et P plus élevées. Mais dans les deux conditions de stockage étudiées, ce rapport augmente entre la huitième et la treizième semaine, alors que la valeur W a commencé à décroître. On peut donc considérer que ce rapport, qui permet de comparer des farines de caractéristiques rhéologiques différentes, n'est pas utilisable pour suivre l'évolution d'une même farine au cours du stockage. La raison de la différence de signification de ce rapport devra être précisée dans des études ultérieures.

4. — *Groupements soufrés*

Nous avons déterminé le taux des groupements SH libres et totaux immédiatement après mouture et après des durées de stockage variant de une à seize semaines. Nous avons observé que le taux des SH libres reste constant dans les farines C alors qu'il augmente de façon continue mais faible dans le cas des farines A (fig. 4).

La teneur en groupements SH totaux, dosables après sulfitolyse, et par conséquent celle en liaisons disulfures, croît pendant les premières semaines, puis diminue nettement dans les deux types de stockage jusqu'à la treizième semaine pour remonter légèrement de la treizième à la seizième semaine dans les farines A. Cependant le comportement des farines A et C est un peu différent dans la première phase. Dans le cas des échantillons stockés en atmosphère aérée, l'augmentation a lieu dès la mouture pour atteindre un maximum après trois semaines, tandis que la teneur en SH totaux des échantillons C passe par une période de légère diminution pendant la première semaine puis croît rapidement pour atteindre sa valeur maximale ; aussi, durant la troisième semaine, cette valeur est supérieure à celle des farines A.

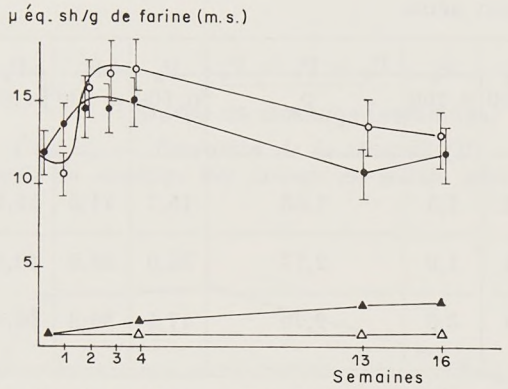


FIG. 4. — *Évolution des taux de groupements sulfhydriles et de liaisons disulfures en fonction de la durée du stockage des farines en milieu aéré* (A) *et confiné* (C)

Farine A { ● S-S ▲ SH libres Farine C { ○ S-S △ SH libres

Donc, tout se passe comme si certaines liaisons S—S existaient dès la mouture, alors que d'autres se formeraient durant les trois premières semaines de stockage. La formation de ces nouvelles liaisons disulfures se ferait avec des vitesses différentes suivant l'aération de la farine. Cette oxydation se produit sans que le nombre de SH libres varie. Certains groupes sulfhydriles seraient donc sous une forme inaccessible au dosage.

Nous pensons pouvoir expliquer la diminution des liaisons disulfures au cours de la deuxième phase par le fait que la vitesse d'oxydation de divers autres constituants de la farine l'emporterait sur celle des groupes SH. Au bilan, ceci aboutirait à une réduction progressive des liaisons disulfures en groupements sulfhydriles libres qui seraient eux-mêmes progressivement impliqués dans de nouvelles liaisons, probablement de type hydrophobe (HEITMAN, 1968 ; GODON, 1969) et de ce fait masqués au dosage. La différence de comportement entre les farines A et C pourrait alors provenir du fait que l'aération augmente les réactions d'oxydo-réduction et donc la vitesse de réduction des groupes sulfhydriles.

5. — *Acides gras libres*

Les dosages d'acides gras libres ont été effectués aux temps 0, 1 et 13 semaines. Les résultats rassemblés dans le tableau 3 montrent une augmentation nette des acides gras libres au cours de la première semaine, à peu près comparable pour les

échantillons A et C. Tandis qu'après treize semaines cette acidité grasse des farines C a continué à augmenter, celle des farines aérées a légèrement diminué.

Avant d'étudier la répartition des différents acides gras, nous nous sommes assurés que les modifications éventuelles d'activité lipolytique ne s'accompagnaient pas de variations qualitatives. En effet, dès le début du stockage, nous avons observé que les lipides des lots aérés subissaient une hydrolyse nettement plus rapide que ceux des autres lots ; mais la composition des acides gras libérés par cette hydrolyse ne varie pas avec l'activité lipasique, comme l'a montré une étude préliminaire.

TABLEAU 3

Évolution des acides gras libres

Échantillons et temps (en semaines)	Acides gras libres totaux (exprimés en mg d'acide oléique présents dans 10 g de farine)	Pourcentage relatif des acides gras libres					
		C_{16}	$C_{16:1}$	C_{18}	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$
t_0	2,9	21,0	0,89	1,22	13,25	61,0	3,12
t_1 C	5,1	27,3	1,52	1,52	8,69	57,7	3,25
t_1 A	5,3	30,8	2,63	2,11	14,1	48,4	1,85
t_{13} C	7,0	17,5	1,42	1,34	9,28	65,0	4,28
t_{13} A	4,7	34,0	4,00	2,47	8,96	49,7	0,92

Le tableau 3 fournit aussi le pourcentage de chacun des acides gras, qui varie différemment selon les conditions de stockage. On constate que :

— le pourcentage de l'acide palmitique (C_{16}, saturé) augmente dans les lots de farine A mais diminue dans les farines C ;

— le pourcentage de l'acide palmitoléique ($C_{16:1}$, mono-insaturé) augmente sensiblement dans les farines aérées, contrairement aux autres ;

— la teneur en acide stéarique (C_{18}, saturé) croît légèrement dans les seules farines A ;

— celle de l'acide oléique ($C_{18:1}$, mono-insaturé) décroît très faiblement dans les farines C tandis qu'elle passe par un maximum après une semaine de stockage en milieu aéré ;

— enfin, la teneur des acides linoléique ($C_{18:2}$, bi-insaturé) et linolénique ($C_{18:3}$) décroît dans les farines aérées mais augmente dans les autres.

Nous avons donc mis en évidence des modifications de la composition en acides gras libres des farines au cours du stockage ; ces modifications varient elles-mêmes selon les conditions d'aération. Dans le cas des farines A, la croissance du taux d'acides gras libres dépend surtout d'une augmentation des acides gras à 16 carbones, bientôt accompagnée d'une diminution des acides gras insaturés à 18 carbones. Dans le cas des farines C, on observe d'abord une augmentation de la teneur des

acides gras les plus courts, suivie d'une croissance des taux d'acides linoléique et linolénique.

6. — *Produits d'oxydation des acides gras insaturés*

Les composés apolaires en solution dans le cyclohexane ont été étudiés en lumière ultraviolette. Le spectre d'absorption présente des pics dans deux régions distinctes, caractéristiques des produits d'oxydation des acides gras : un pic à 230 nm, caractéristique des doubles liaisons conjuguées des hydroperoxydes qui constituent les produits primaires d'oxydation des acides gras insaturés ; des pics à 260, 273 et 279 nm, dus aux divers produits secondaires de cette oxydation.

Dans cette étude préliminaire, nous avons uniquement comparé les farines stockées pendant treize semaines dans les deux conditions d'aération, en partant d'une même farine initiale. Les résultats exprimés en densité optique sont rapportés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Estimation des produits d'oxydation :
absorption en densité optique des extraits lipidiques dans l'ultraviolet
après 13 semaines de stockage

Échantillons	230 nm	260 nm	273 nm	279 nm
C	2,55	0,395	0,369	0,357
A	0,867	0,547	0,507	0,493

Dans l'ultraviolet, l'absorption de chacun de ces produits est plus importante dans le cas des farines A. Elles contiennent donc beaucoup plus de produits primaires et secondaires de l'oxydation des acides gras que les farines C stockées en atmosphère confinée.

L'étude de l'évolution de ces divers produits au cours du temps fait l'objet de travaux en cours.

7. — *Pigments caroténoïdes*

La couleur jaune des extraits lipidiques de farines diminue sensiblement après quelques semaines de stockage en atmosphère aérée.

Après avoir extrait à froid dans le cyclohexane les composants apolaires des farines A et C stockées, comme précédemment, pendant treize semaines, nous avons mesuré l'absorption de ces solutions au spectrophotomètre dans la région du visible correspondant au bleu-violet.

Le spectre (fig. 5) présente des pics nettement marqués à 425, 450 et 480 nm. Chacun de ces trois pics est la résultante des absorptions des composés caroténoïdes (carotènes, xanthophylles, xanthines) qui ne peuvent pas être différenciés dans de tels mélanges. L'écart des densités optiques observé entre les deux solutions lipidiques est sensible ; la décoloration, due à une oxydation des caroténoïdes, est beaucoup plus importante dans le cas d'un stockage aéré que pour les farines C.

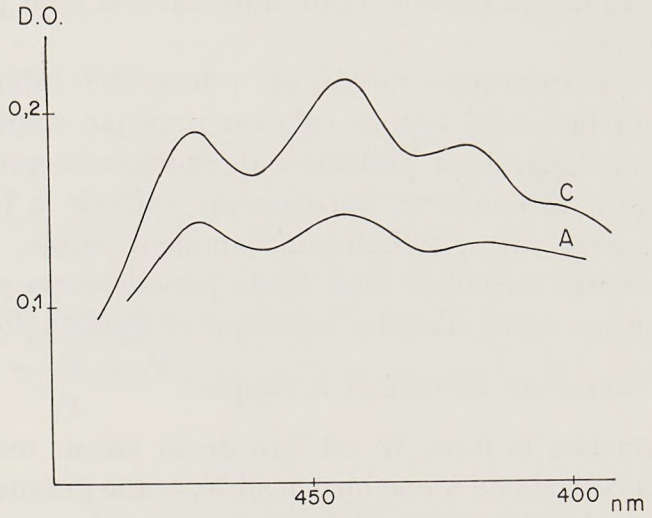


FIG. 5. — *Spectres d'absorption dans le visible des extraits lipidiques des farines stockées 13 semaines en milieu aéré* (A) *et confiné* (C)

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

En reprenant l'ensemble de nos résultats, nous observons que les farines stockées en milieu confiné ne présentent qu'une variation limitée de leur force boulangère W. Leur évolution chimique se caractérise par une augmentation de l'acidité, due à une accumulation d'acides linoléique et linolénique qui ne sont que lentement oxydés, et par une oxydation importante des groupes SH suivie d'une réduction des liaisons disulfures. Cette réduction est suffisamment lente pour que les groupements sulfhydriles puissent être impliqués au fur et à mesure de leur formation dans des liaisons probablement hydrophobes. Dans le même temps, la solubilité des protéines du gluten dans l'acide acétique décroît, alors que le rapport $\frac{P_0 + P_1 + P_4}{P_2}$ des pourcentages des fractions chromatographiques F_0, F_1, F_2 et F_4 augmente.

Les farines stockées en milieu aéré subissent une évolution importante de l'ensemble de leurs caractéristiques rhéologiques, qui se traduit par une forte augmentation de la force boulangère W. Leur acidité grasse augmente au début du stockage puis décroît légèrement ; cette libération d'acides gras provoquée dès la première semaine sous l'action de la lipase permet une oxydation rapide des produits insaturés par intervention de la lipoxygénase. Les caroténoïdes sont décolorés, des produits d'oxydation des acides gras apparaissent en grande quantité et la teneur des acides linoléique et linolénique diminue. Les groupes SH subissent une oxydation moins poussée car les liaisons S—S sont réduites d'une manière importante, de telle sorte que le taux de SH libres croît malgré l'implication possible d'un grand nombre de groupements thiols dans les liaisons nouvelles, probablement de type hydrophobe. Le rapport $\frac{P_0 + P_1 + P_4}{P_2}$, lié au rapport $\frac{\text{gluténines}}{\text{gliadines}}$, s'accroît plus vite que pour les autres farines.

En conclusion, nous voyons que, à la température de 20°C et en atmosphère assez sèche, les farines stockées en milieu aéré évoluent beaucoup plus nettement

que celles maintenues en milieu confiné. Cette différence ne peut pas être due à l'action des micro-organismes.

Pour obtenir une « maturation » rapide, on a donc bien intérêt à maintenir les farines dans un endroit bien aéré comme cela est pratiqué couramment ; pour les conserver un temps plus long, il est préférable de stocker les produits de mouture dans une enceinte fermée. Si l'on veut, par exemple, obtenir la force boulangère la plus grande possible, avec une élasticité suffisamment faible, il convient de la stocker deux à six semaines en milieu aéré. Cette période correspond à une acidité moyenne, à une proportion faible d'acides linoléique et linolénique libres ; la solubilité du gluten a déjà beaucoup diminué et le rapport $\frac{P_0 + P_1 + P_4}{P_2}$ est alors élevé. Avant la troisième semaine, la force W est loin de sa valeur maximale, le gonflement G est grand. Ceci correspond à une forte acidité, à une grande quantité d'acides linoléique et linolénique, à une grande solubilité dans l'acide acétique des protéines qui n'ont pas alors acquis leur capacité optimale à développer des interactions. Après la sixième semaine, le rapport $\frac{\text{ténacité}}{\text{extensibilité}}$ devient très grand et caractéristique d'une pâte qui a du mal à former les alvéoles nécessaires à l'obtention d'un pain léger et facilement digestible. Dans le même temps, la solubilité du gluten devient plus faible, par suite vraisemblablement de l'implication de nombreux groupes SH dans les liaisons hydrophobes. L'acidité grasse a diminué parallèlement à la destruction des caroténoïdes et à l'apparition de nombreux produits d'oxydation.

Nous nous attachons maintenant à préciser l'enchaînement des phénomènes d'oxydo-réduction qui entraînent les modifications de la valeur technologique.

Reçu pour publication en octobre 1972.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme Poisson, du laboratoire de Microbiologie de la Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., Paris, pour sa collaboration au contrôle microbiologique des farines, et M. Drapron, de la Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., Massy, qui a bien voulu se charger de l'analyse des acides gras libres.

SUMMARY

PRELIMINARY STUDY ON THE MATURATION OF WHEAT FLOURS. INFLUENCE OF AERATION UPON THE EVOLUTION OF VARIOUS BIOCHEMICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS

A comparative study of storage with aerated and confined flours, at 20°C in a dry atmosphere, has shown important differences with regard to their evolution, independently of the action of the microorganisms. After the grinding of *Triticum vulgare* (variety *Capitole*) grains, the flours which have been stored in confined conditions show only small changes in their baking strength which is maximal after four weeks, and an increasing of acidity owing to an

accumulation of linoleic and linolenic acids which are slowly oxidised. However, the reduction of the disulfid bonds is slow so that the sulfhydril groups are, as soon as they appear, involved into new bonds, probably hydrophobic bonds ; in the meantime the gluten proteins' solubility decreases.

The air-stored flours show a considerable evolution of all their rheological characteristics with a greatly increasing baking strength ; meanwhile, the fat acidity increases during the first weeks, owing to lipolytic action, then slowly decreases, under the action of lipoxidase. As many oxidations are affecting these flours, the carotenoids are fading, products of oxidation of the fatty acids appear and the proportion of linoleic and linolenic acids drops. In the meantime, the disulfur bonds are reduced so much that the thiol groups' rate is increasing in spite of the many sulfhydril groups being involved in probably hydrophobic.

To get a rapid « maturation », it is better to store the flours in an aerated place, but to conserve them for a long time, it is preferable to keep them in a closed atmosphere.

RESUMEN

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA « MADURACION » DE LAS HARINAS DE TRIGO. INFLUENCIA DE LA VENTILACION SOBRE LA EVOLUCION DE DIVERSAS CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y FISICOQUIMICAS

Un estudio comparativo de la maduración de las harinas de trigo *Capitole* ha sido llevado a cabo en atmósfera ventilada y en atmósfera confinada, con objeto de determinar la influencia de la ventilación respecto a algunas de sus propiedades bioquímicas y fisicoquímicas, independientemente de cualquier desarrollo microbiológico. Las harinas han sido estudiadas en el momento del almacenamiento durante dieciseis semanas, desde el punto de vista de las variaciones de su contenido en ácidos grasos, de la evolución de los pigmentos, de ciertas características del gluten y de su contenido en enlaces disulfuros y grupos sulfhidrilos.

Las harinas almacenadas en medio ventilado presentan modificaciones de las propiedades estudiadas mucho más importantes que los lotes situados en medio confinado : aumento acusado del W del alveograma, crecimiento de la acidez grasa al principio del almacenamiento con motivo de la lipólisis y, acto seguido, lenta disminución debido a la acción de la lipoxigenasis, descoloración de las carotenoides, aparición de productos de oxidación de los ácidos grasos, disminución del contanido de los ácidos linoleico y linolénico y, asimismo, reducción de los enlaces S-S.

Este estudio ha permitido establecer la concordancia entre las variaciones de las propiedades reológicas y las modificaciones de algunos de los componentes estudiados.

RIASSUNTO

STUDIO PRELIMINARE DELLA « MATURAZIONE » DELLE FARINE DI FRUMENTO INFLUENZA DELL'AERAZIONE SULL EVOLUZIONE DELLE DIVERSE CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE E FISICO-CHIMICHE

E'stato realizzato uno studio comparativo della maturazione delle farine di frumento *Capitole* in atmosfera aerata e in atmosfera chiusa per determinare l'influenza dell'aerazione su alcune delle loro proprietà biochimiche e fisicochimiche, indipendentemente da ogni sviluppo microbiologico. Le farine sono studiate durante l'immagazzinamento di seidici settimane, dal punto di vista delle variazioni del tenore di acidi grassi, dell'evoluzione dei pigmenti, di alcune caratteristiche di glutine e del suo tenore in legami disolfuri e gruppi solfidrili.

Le farine immagazzinate in atmosfera aerata presentavano delle alterazioni delle proprietà studiate, molto più importanti rispetto ai lotti che erano stati posti in atmosfera non aerata : forte aumento del W dell'alveogramma, aumento dell'acidità grassa all'inizio dell'immagazzina-

mento in seguito alla lipolisi, poi diminuzione lenta sotto l'azione della lipossigenasi, scolorazione dei carotenoidi, apparizione di prodotti d'ossidazione degli acidi grassi, diminuzione del tenore degli acidi linoleico e linolenico, riduzione dei legami S-S.

Questo studio ha permesso di fare una correlazione tra le variazioni delle proprietà reologiche con le modifiche di alcuni dei costituenti studiati.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bailey C. H., 1925. The chemistry of wheat flour. *Amer. Chem. Soc., Monograph chemical catalog.*, chap. 9, 177-193, New York.

Baker J.-C., Parker H. K., Mize M. D., 1944. The action of oxidising agents on sulfhydryl compounds in dough. *Cereal Chem.*, **21**, 97-107.

Balland A., 1904. Sur la conservation des farines par le froid. *C. R. Acad. Sci.*, **139**, 473-475.

Barton-Wright E. C., 1938. Studies on the storage of wheat flour. III. Changes in the flora and the fats and the influence of the changes on gluten characters. *Cereal Chem.*, **15**, 521-541.

Benesch R., Benesch R. E., 1952. Reactions of thiol with organic mercury compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 425-441.

Buré J., Gay P., 1964. Les lipides de la farine et leur rôle dans la valeur boulangère. *Ind. agric. aliment.* (3), 175-183 ; 275-288.

Buttiaux R., Beerens H., Tacquet A., 1968. *Manuel de techniques bactériologiques*, chap. 5, 47-60. Éditions médicales Flammarion, Paris.

Cassagne H., 1961. *Milieux de culture.* Collection technique de base, **2**, 415 p. Éditions La Tourelle, Saint-Mandé.

Cathcart W. H., Killen E. J., 1939. Changes in flour on storage with special reference to the effect of different types of bags. *Cereal Chem.*, **16**, 798-817.

Caubet B., Coqueblin L., 1910. *Traité pratique de meunerie*, 177. Dunod-Pinet, Paris.

Chopin M., 1921. Relations entre les propriétés mécaniques des pâtes de farine et la panification. *C. R. Acad. Sci.*, **172**, 450-452.

Cuendet L. S., Larson E., Norris C. G., Geddes W. F., 1954. The influence of moisture content and others factors on the stability of wheat flours at 37°8C. *Cereal Chem.*, **31**, 362-389.

Daniels N. W. R., Wood P. S., Russel P. W., Eggit P. W. R., Coppock J. B. M., 1970. Studies of the lipids of flour. V. Effect of air on lipid binding. *J. Sci. Food agric.*, **21** (7), 377-381.

Drapron R., Uzzan A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **22** (1), 407-408.

Drapron R., Sclafani L., 1969. Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. *Ann. Technol. agric.*, **18** (1), 5-16.

Godon B., 1969. *Étude physico-chimique des associations protéiques du gluten de blé.* Thèse de Doctorat d'État es Sciences physiques, Paris.

Gracza R., 1965. Aging and storage studies in flours and air-classified flour fractions. *Cereal Chem.*, **42** (4), 333-338.

Guillemet R. Sonntag G., 1943. Action des oxydants sur les protéides de la farine de blé. *C. R. Acad. Sci.*, **216**, 420-422.

Heitman P. 1968. A model for sulfhydryl groups in proteins. Hydrophobic interactions of the system side chain in micelles. *Europ. J. Biochem.*, **3**, 346-350.

Hlynka I., 1949. Effect of bisulfite, acetaldehyde and similar reagents on the physical properties of dough and gluten. *Cereal Chem.*, **26**, 307-316.

Hlynka I., Bass E. J., 1949. Reaction of dough and gluten with glucose . *Cereal Chem.*, **26**, 513-518.

Kozmin N. P., 1935. The aging of wheat flour and the nature of this process. *Cereal Chem.*, **12**, 165-171.

Kuchumova L. P., Strelnikova M. M., 1967. Les groupes sulfhydriles et les ponts disulfures du gluten des blés vitreux et farineux (en russe). *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, S. S. S. R., **3** (5), 392-396.

Kuninori T., Sullivan Betty, 1968. Disulfide-sulfhydryl interchange studies of wheat flour. II. Reaction of glutathione. *Cereal Chem.*, **45** (5), 486-495.

Loeb J., 1930. *Étude des phénomènes diastasiques dans les farines de froment et contribution à l'étude de la fermentation panaire.* Thèse Université, Strasbourg.

Mecham D. K., Pence J. W., 1957. Flour lipids. *Baker's Digest*, **31**, 40-44.

Pochon J., Barjac H., 1958. *Traité de microbiologie des sols*, 329-408. Dunod, Paris.

Poisson Jeanne, Bègué D., Bourbon G., 1957. Conservation de la qualité des farines. Évolution des caractères technologiques des farines conservées en cellules étanches en fonction de la température et de la teneur en eau. *Meunerie franç.*, (127), 21-34.

Poisson Jeanne, Guilbot A., 1957. Microflore des farines françaises : composition et évolution. *Ann. Technol. agric.*, 63-85.

Pratt D. B. Jr, 1957. Chemical and baking changes which occur in bulk flour during short term storage. *Cereal Sci. Today*, **2**, 191-195.

Schlenk M., Gellerman J. L., 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Anal. Chem.*, **32**, 1412-1413.

Sosedov N. I., Gorelova E. I., Moskvittna M. G., Kiyanova V. I., 1967. L'aération comme méthode d'accélération de l'évolution de la farine pendant le stockage (en russe). *Appl. Biokhim. Mikrobiol.*, S. S. S. R., **3** (1), 5-91.

Sullivan Betty, Dahle L. K., Schipke, J. H. 1963. The oxidation of wheat flours. III. Labile and non labile sulfhydryl groups. *Cereal Chem.*, **40** (5), 515-523.

Tsen C. C., Hlynka I., 1962. The role of lipids in oxidation of doughs. *Cereal Chem.*, **39** (3), 209-219.

Tsen C. C., Hlynka I., 1963. Flour lipids and oxidation of sulfhydryl groups in dough. *Cereal Chem.*, **40** (2), 145-153.

Wolf J., 1968. Dosage spectrophotométrique des peroxydes. *Manuel d'analyse des corps gras*, 250. Azoulay, Paris.

Yoneyama T., Suzuki I., Murohashi M., 1970. Natural maturing of wheat flour. I. Changes in some chemical components and in farinograph and extensigraph properties. *Cereal Chem.*, **47** (1), 19-26.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (2), 163-181.

CRITÈRES INDUSTRIELS ET CRITÈRES DE SÉLECTION POUR APPRÉCIER LA VALEUR D'UTILISATION DES BLÉS TENDRES (1)

A. BOURDET, Renée BERRIER et J.-C. AUTRAN
avec la collaboration technique de Raymonde CLAUX

Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I. N. R. A.,
École nationale supérieure de Meunerie et des Industries céréalières,
16, rue Nicolas Fortin
75013 Paris

RÉSUMÉ

L'appréciation de la valeur boulangère de différents types de blé tendre a été effectuée soit directement à l'aide d'essais de cuisson, soit indirectement par diverses méthodes physiques, chimiques, rhéologiques et enzymatiques, les unes relevant du contrôle industriel classique, les autres spécialement adaptées à de faibles quantités de matériel.

Deux types d'essais de cuisson ont été utilisés : l'un réalisé au fournil expérimental sur 2 kg de farine selon la technique française de pétrissage intensifié ; l'autre est un test de laboratoire à échelle réduite qui utilise seulement 40 g de farine.

Après avoir précisé comment se répartissaient, entre les divers blés, les valeurs fournies par les différents tests directs ou indirects, on compare l'influence exercée sur le volume des pains par un traitement mécanique ou chimique des pâtes et discute de leur « tolérance » avant la mise au four.

Les résultats fournis par les deux méthodes de cuisson sont comparés, et on présente les corrélations associant significativement ou non les différents tests indirects au volume des pains obtenus selon chaque procédé.

On discute enfin de la signification technologique qu'il convient d'attribuer aux critères industriels classiques et aux microtests destinés à la sélection, et on souligne l'intérêt que présenterait, à ce niveau, un microtest de cuisson servant de référence pour apprécier de façon plus générale le potentiel technologique des blés.

Mots clés : *blés tendres, valeur d'utilisation, méthodes d'appréciation, essais de cuisson, sélection.*

(1) Travail réalisé sous l'égide et avec l'aide de la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique, dans le cadre de l'action concertée n° 68-01-135.

I. — INTRODUCTION

Il en est des blés tendres comme de toute matière première destinée à être transformée : leur valeur d'utilisation diffère selon la nature des produits finis à obtenir. Tel blé convenant à la boulangerie répondra mal ou pas du tout aux besoins de la biscuiterie ou de la biscotterie et inversement.

Si les influences exercées sur les caractéristiques intrinsèques de cette matière première lors de sa production (sol, climat, méthodes culturales), puis de sa transformation, ne sauraient être négligées, il est de plus en plus évident, aux yeux des utilisateurs, que le problème de la qualité technologique des blés se situe d'abord au niveau variétal.

Pour que la production puisse disposer de semences détenant toutes les caractéristiques technologiques souhaitées par les différents secteurs de l'utilisation, il est essentiel que soient mis en œuvre, et aussi précocement que possible dans les programmes de sélection, des critères capables de rendre compte du potentiel technologique des futures variétés.

Parce que la boulangerie constitue le domaine principal d'utilisation, c'est dans l'optique particulière de l'aptitude des blés à la panification qu'a été entreprise la présente étude. En se référant au comportement à la cuisson des principales variétés de blé actuellement cultivées, elle se proposait de préciser la signification technologique des critères de qualité les plus couramment utilisés en meunerie et en boulangerie, comparativement à certaines microméthodes, dont un essai de cuisson miniaturisé, plus particulièrement destinées aux études de sélection.

II. — MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. — *Nature des échantillons étudiés*

Les travaux ont porté sur 17 variétés françaises de blé tendre représentant au total 28 échantillons répartis sur trois années de production : 16 concernent la récolte 1968, 2 celle de 1969 et 10 la récolte 1970. En voici la liste, qui comporte 13 variétés d'hiver et 4 de printemps (*) et précise le nombre d'échantillons correspondants (tabl. 1).

TABLEAU I

Nature des échantillons de blé étudiés

Variétés	Récolte 1968	Récolte 1969	Récolte 1970	Variétés	Récolte 1968	Récolte 1970
*Aronde**	1			*Magdalena*		1
*Atys**		1		*Major*		3
Capitole	2	1		*Montjoie*		1
Cappelle	2			*Ouest*	1	
Champlein	2			*Progress**	1	
Dragon			2	*Rex**	2	
Étoile de Choisy	1			*Splendeur*	1	
Flinor			1	*Wimax*	1	2
Joss	2					

Selon les quantités de grain disponibles (de 10-12 kg à 200-300 kg), la préparation des farines a été réalisée au moulin type semi-industriel (taux d'extraction TE = 72-75 p. 100), soit au moulin Bradenber Senior (TE = 70 p. 100 environ), soit encore, pour les 10 échantillons de la récolte 1970, au moulin d'essai Miag (TE = 74 - 76 p. 100).

Pour certaines méthodes applicables à des moutures intégrales des grains, le broyage a été effectué sur quelques dizaines de grammes au broyeur à marteaux de laboratoire type Culatti.

B. — *Méthodes utilisées*

L'appréciation de la qualité a été effectuée soit directement à l'aide d'essais de cuisson, soit indirectement à l'aide de diverses méthodes, les unes relevant du contrôle industriel classique, les autres spécialement adaptées à de faibles prises d'échantillons.

1. *Essais de cuisson.*

Ils ont été réalisés sur les mêmes échantillons selon deux méthodes : l'une, dite de pétrissage intensifié, conçue dans l'optique particulière de la technique actuelle de panification française et récemment modifiée dans le cadre du C. N. E. R. N. A. (1969) ; réalisée au fournil expérimental, elle nécessite de 1,5 à 2 kg de farine. L'autre est une méthode de laboratoire à échelle réduite, élaborée par nos soins, qui n'utilise que 40 g de farine (Bourdet et Berrier, 1971).

a) *Panification fournil.*

Elle réclame comme principaux équipements des pétrins type Artofex à mouvement cycloïdaux et à deux rapports de vitesse (50 et 70 tr/mn), une chambre de fermentation, un four de cuisson de grande capacité avec dispositif de production de buée, un appareil de mesure du volume des pains.

On incorpore à la farine 2 p. 100 de son poids de levure, 2,2 p. 100 de sel et une quantité d'eau telle que la consistance de la pâte obtenue, déterminée préalablement au farinographe après 12 minutes de pétrissage, soit voisine de 300 UB. La confection de la pâte destinée à l'essai comporte un pétrissage d'une durée totale de 20 minutes se décomposant en une première phase de 3 minutes à vitesse lente, d'une deuxième phase de 12 minutes à vitesse rapide suivie d'un repos de 3 minutes enfin d'une dernière phase de 5 minutes à vitesse rapide. Le nombre total de brassages est de 1 400.

La première fermentation en masse (dite « pointage »), réalisée à 27°C et vers 70 p. 100 d'humidité relative, contrôlée par un mesureur de pousse, a une durée de 1 heure à 1 heure 30. La pâte est ensuite divisée en 6 pâtons de chacun 350 g qui subissent un repos d'environ 15 minutes avant d'être façonnés et soumis à une seconde fermentation à 27°C sur couche (dite « apprêt ») dont la durée peut varier de 1 heure 45 à 2 heures 30 selon les farines.

La cuisson, réalisée directement sur sole à 260°C en présence d'un excès de vapeur d'eau, est de 25 minutes. La mesure du volume des pains intervient 1 heure après la sortie du four.

b) *Panification de laboratoire à échelle réduite.*

L'équipement utilisé, en rapport avec la prise d'essai, se compose de micropétrins type Mixographe, munis de broches, à cuve fixe (170 ml) et à tête mobile de vitesse constante (90 tr/mn), d'une étuve de fermentation à température et hygrométrie contrôlées, d'un four de cuisson type Chopin de faible capacité (cuisson simultanée possible de 5 à 6 pâtons), de moules métalliques de forme tronc-pyramidale (250 ml) et d'un dispositif de mesure du volume des pains.

Les doses de levure et de sel sont les mêmes que précédemment et les taux d'hydratation des farines sont déterminés au préalable à l'aide du microfarinographe (10 g) pour une même consistance de 300 UB. Le pétrissage est réalisé en continu pendant 9 minutes soit 810 tours au total.

Le pâton (60 à 70 g selon les farines) subit une première fermentation de 1 heure à 27°C ; il est ensuite façonné manuellement, déposé dans le moule et soumis à une seconde fermentation de 2 heures 30 à 27°C.

La cuisson s'effectue directement dans le moule pendant 20 minutes à 250°C ; on mesure le volume du pain 2 heures après sa sortie du four.

Alors que, dans l'essai fournil, la pâte est constituée essentiellement de farine, eau, levure et sel, les essais à échelle réduite ont été conduits selon deux formules, l'une comportant une addition de saccharose (1,5 p. 100 de la farine), l'autre d'acide ascorbique (5 mg p. 100 g de la farine). L'adjonction de saccharose, sans influence appréciable à la dose utilisée sur les propriétés rhéologiques des pâtes, visait à prévenir les déficiences éventuelles des farines en sucres fermentescibles, de sorte que ce paramètre ne constituât pas un facteur limitant.

En additionnant la pâte d'acide ascorbique, seul additif chimique de panification admis par la législation française, nous avons cherché à réaliser par cette voie l'amélioration obtenue par traitement mécanique en pétrissage intensifié.

Pour les deux méthodes, les résultats des essais sont exprimés par le volume des pains obtenus (ml) pour 100 g de farine telle quelle mise en œuvre.

2. *Méthodes classiques de contrôle.*

Les caractéristiques des grains et des farines, soit physiques (poids de 1 000 grains, vitrosité), soit chimiques (teneur en matières minérales et en protides totaux), soit rhéologiques (indices alvéographiques W, G, P et P/L), soit enzymatiques (indice de temps de chute), ont été déterminées selon les méthodes appliquées classiquement aux blés tendres, méthodes qui viennent d'être rassemblées et décrites en détail dans une brochure récemment éditée (Mauze *et al.*, 1972).

3. *Méthodes à échelle réduite.*

Elles font appel à différentes caractéristiques rhéologiques, physico-chimiques et biochimiques des grains ou des farines.

a) *Microfarinographe.*

Utilisant des prises d'essai de 10 g, la méthode a été appliquée soit aux farines, soit aux moutures intégrales des grains correspondants.

Pour les pâtes de farine, on détermine la quantité d'eau nécessaire (taux d'hydratation) pour obtenir une consistance de 300 UB après 12 minutes de pétrissage, identique à celle utilisée pour les essais de cuisson.

Le procédé appliqué aux pâtes de grains broyés, selon le protocole défini par Leclercq (1961) pour des prises d'essai de 50 g, utilise au contraire une hydratation constante de 70 p. 100. On détermine ainsi la consistance (UB) de la pâte obtenue après un pétrissage de 12 minutes, et une surface S (cm^2) extérieure à la courbe qui combine les mesures de consistance et de développement.

b) *Indice de sédimentation.*

Établie en 1947 par Zeleny, puis revue en 1957 (Pinckney *et al.*), la méthode utilise 3,2 g de farine préparée dans des conditions définies (taux d'extraction 15 p. 100 environ).

Elle est fondée sur la capacité de gonflement des protéines du gluten en milieu acide et consiste à mesurer le volume (ml) du sédiment d'une suspension de farine dans l'acide lactique, dans des conditions d'agitation et de repos normalisées.

c) *Capacité d'absorption.*

Comme la précédente, cette méthode, proposée par Finney et Yamazaki (1946), utilise la capacité d'hydratation des protéines en milieu acide.

Elle a été pratiquée sur grains broyés. La prise d'essai (2 g) est mise en suspension dans une solution d'acide lactique 20 p. 100 ; après 15 minutes de repos, on centrifuge 10 minutes à 25 000 *g* et élimine le surnageant. La quantité d'eau retenue est déterminée par la différence de poids avant et après l'opération. Les résultats sont exprimés en pourcentages.

d) *Composition protéique du gluten.*

Le protocole expérimental inspiré d'Osborne (Feillet, 1965 ; Bourdet, 1966), permettant de déterminer les principaux groupes protéiques sur la base de leurs caractères de solubilité, a été adapté à de faibles prises d'essai et simplifié pour permettre des déterminations de série. Cette version utilise la glycolmonochlorhydrine (GMC) au lieu de l'éthanol pour solubiliser la fraction gliadine, ce qui a pour avantage de supprimer toute agitation et d'abréger les opérations. La validité de la méthode a été contrôlée quantitativement par comparaison avec des extraits éthanoliques classiques et qualitativement par électrophorèse.

Voici l'essentiel de ce protocole appliqué à 1 g (s.s.) de grain broyé : extraction des protéines solubles par NaCl 0,5 M, pH 6,8 (5 ml) 1 heure au froid, puis des gliadines par GMC 25 p. 100 (15 heures + 5 heures + 1 heure) à température ambiante. On décante séparément et directement dans un matras les extraits NaCl et GMC pour dosage de l'azote. La gluténine est calculée par différence entre N total grain — (N NaCl + N GMC). Chaque détermination implique trois dosages d'azote ; on peut travailler par séries de 8 échantillons.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les différentes méthodes de nature physique, chimique, rhéologique ou enzymatique donnent d'intéressantes indications sur les caractéristiques des blés et des farines. Elles ne fournissent toutefois qu'une information incomplète sur leur comportement au stade de la cuisson.

Parce qu'il traduit de façon globale l'influence des divers facteurs connus et inconnus en cause, l'essai de cuisson apparaît donc comme la méthode la plus objective pour apprécier la valeur d'utilisation des blés.

Dans le cadre particulier de cette étude concernant la valeur boulangère, nous exposerons successivement les résultats des essais de cuisson standards et miniaturisés, ceux relatifs aux tests de contrôle usuels, puis ceux fournis par les méthodes à échelle réduite. Nous examinerons enfin dans quelle mesure ces différentes données sont associées entre elles.

A. — *Critères directs d'appréciation. Essais de cuisson*

a) *Répétabilité et reproductibilité des résultats.*

Critère objectif d'appréciation, l'essai de cuisson ne peut constituer une référence valable que dans la mesure où il offre une répétabilité et une reproductibilité suffisantes.

Dans la méthode de panification réalisée au fournil, on retient comme valeur caractéristique d'un échantillon le volume moyen des 6 pains obtenus. Les pâtons subissant des temps de fermentation variables avant la mise au four, la dispersion des 6 valeurs est, dans les meilleures conditions, de ± 3 à ± 5 p. 100 pour un même fournil.

TABLEAU 2

Variation du volume des pains obtenus à partir d'un même échantillon de farine
(essai fournil)

Fournil B	Volume moyen des 6 pains (ml)						Volume moy. (ml)	Coefficient de variation p. 100
	754	764	797	858	857	815	*807,5*	± 5
Fournils	Volume moyen par fournil (ml)							
	A		B		C	D		
	778		807,5		736	707	*757*	± 5,8

Lorsqu'un même échantillon est panifié par plusieurs fournils, une nouvelle dispersion entre les volumes moyens (de l'ordre de ± 6 p. 100 en moyenne) vient s'ajouter à la précédente, comme l'ont montré des circuits d'analyse comportant plusieurs participants (B. I. P. E. A., 1970 à 1972).

Nous indiquons ci-dessus (tabl. 2), à titre d'exemple, quelques résultats significatifs empruntés à un de ces circuits montrant les variations de volume des pains

obtenus à partir d'un même échantillon de farine, par un même fournil d'une part, entre quatre fournils d'autre part. Les volumes indiqués (ml) correspondent à une prise d'essai de 350 g de pâte (210 à 215 g de farine selon l'hydratation), mais sont rapportés à 100 g de farine telle quelle.

Compte tenu de ces variations, les résultats relatifs aux 28 échantillons rapportés dans cette étude ne concernent qu'un seul et même fournil dont la compétence et l'expérience en matière d'essais de panification s'appuient sur une pratique quasi quotidienne.

Les conditions de l'essai miniaturisé ne permettent, pour un échantillon donné, de confectionner qu'un seul pâton à la fois. Des répétitions successives sur différents types de blé ont permis de s'assurer, comme l'indiquent les valeurs suivantes, que la variation entre les volumes atteignait au plus ± 2,5 à ± 3 p. 100 quelle que soit la nature des additifs (tabl. 3).

TABLEAU 3

Variation du volume des pains pour différents types de blé
(micro-essai)

Variétés	Nbre répét.	Volume pain/40 g farine					Moyenne	Coeff. de variation p. 100
Étoile de Choisy ..	5	180	180	180	190	180	*182*	± 2,4
Cappelle	5	240	240	240	240	240	*240*	0
Capitole	5	280	270	285	270	280	*277*	± 2,4

b) *Résultats comparés des essais fournil et laboratoire.*

Parce qu'il a été conçu dans ce but, l'essai de cuisson réalisé au fournil vise essentiellement à apprécier le comportement des différents types de farine dans les conditions qui sont celles de la technique française de panification. Il est donc la résultante de caractéristiques fermentaires et plastiques données, ces dernières étant valorisées sous l'influence du pétrissage intensifié.

L'essai de cuisson miniaturisé, pratiqué selon les deux formules indiquées, repose, comme dans le premier cas, sur une amélioration des propriétés plastiques, à cette différence près qu'une action chimique (acide ascorbique) se substitue au traitement mécanique, non réalisable à cette échelle avec l'équipement utilisé. Il vise en outre, en éliminant les variations possibles sur le plan fermentaire (addition de saccharose), à apprécier certains aspects particuliers de ces propriétés plastiques et notamment l'aptitude plus ou moins marquée des pâtes à se développer sous l'influence d'une poussée gazeuse prolongée, caractéristiques de très grande importance en technologie boulangère.

Les résultats obtenus sur les mêmes 28 échantillons selon ces deux méthodes sont résumés dans le tableau 4. On notera que les micro-essais comportant une addition de saccharose ont été réalisés à deux durées d'apprêt (2 heures 30 et 3 heures).

On constate que les volumes moyens des pains obtenus dans les différentes condi-

tions du micro-essai restent inférieurs à celui fourni par le pétrissage intensifié.

Les distributions relatives des valeurs par rapport à la moyenne, calculées à partir des écarts-types, font apparaître, en revanche, que les volumes des pains se répartissent sur une échelle notablement plus large dans le cas des micro-essais (16,5 à 20,6 p. 100) que dans le cas des essais fournil (9,9 p. 100).

TABLEAU 4

Résultats comparés des essais de cuisson en version classique et micro-essais

N = 28	Volumes des pains (ml/100 g farine)			
	Fournil	Micro-essais		
	Pétrissage intensifié	+ ac. ascorbique	+ saccharose	
		2 h 30	2 h 30	3 h
Extrêmes	535-825	475-825	350-750	325-750
Moyennes	*688*	*617*	*592*	*600*
Distribution relative p. 100	± 9,9	± 16,5	± 17,9	± 20,6

Il n'apparaît pas que le fait d'utiliser des moules soit plus favorable à la différenciation des échantillons que la cuisson traditionnelle sur sole. Au contraire, comme l'indiquent les valeurs suivantes empruntées à une étude antérieure ayant concerné 13 échantillons panifiés dans les conditions du pétrissage intensifié (BOURDET *et al.*, 1971), la distribution relative des volumes se révèle plus faible lorsque la cuisson

TABLEAU 5

Variation du volume des pains obtenus en moules ou sur sole

N = 13	Volumes extrêmes (ml)	Volume moyen (ml)	Distribution relative p. 100
Moules	408-554	*506*	± 8,6
Sole	341-603	*537*	± 14,6

est réalisée en moules que lorsqu'elle est faite sur sole. Il en est de même en ce qui concerne le volume moyen des pains obtenus (tabl. 5).

Il semble donc que la technique du pétrissage intensifié tende à niveler les différences d'aptitude boulangère entre les divers types de blés ; les conditions utilisées

en micro-essais, indépendamment de l'emploi de moules, tendent au contraire à les accroître, offrant ainsi une meilleure différenciation.

Les volumes des pains obtenus en micro-essais en présence d'acide ascorbique sont significativement associés à ceux auxquels conduit l'addition de saccharose, que la durée d'apprêt soit de 2 heures 30 ($r = + 0{,}55$) ou de 3 heures ($r = + 0{,}52$).

En revanche, une corrélation à la limite de signification ($r = + 0{,}37$ pour $N = 28$ et sécurité 95 p. 100) associe les volumes des pains obtenus en pétrissage intensifié et ceux des micro-essais, et ceci uniquement pour la formule acide ascorbique. C'est en effet seulement en présence de cet améliorant, pour les essais à échelle réduite, que le volume moyen des pains (617 ml) est le plus proche de celui des essais réalisés au fournil (688 ml).

c) *Influence de l'acide ascorbique sur le volume des pains.*

Les interprétations qui suivent montrent en fait que l'influence de l'acide ascorbique n'est pas identique pour tous les types de blé.

Si le volume du pain est, pour une très large part, l'expression des propriétés plastiques associées à telle ou telle variété, on peut considérer, dès l'instant où l'approvisionnement en sucres fermentescibles se trouve assuré, que la formule comportant une addition de saccharose constitue, du point de vue des caractéristiques plastiques, l'essai de référence. On peut alors, par comparaison à cet essai témoin, préciser la réaction des différentes variétés.

On constate ainsi que l'incorporation d'acide ascorbique se traduit par une amélioration de volume pour 17 échantillons (61 p. 100 des cas), par un volume inchangé pour 4 échantillons (14 p. 100 des cas) alors que les 7 autres accusent une diminution.

L'accroissement de volume est en moyenne de 18 p. 100. Il apparaît très important pour des variétés (récolte 1968) comme *Joss* (33 p. 100), *Étoile de Choisy* (36 p. 100) et *Champlein* (47 p. 100) ; il se situe entre 11 et 25 p. 100 pour *Capitole, Cappelle, Major, Dragon* et *Aronde*, entre 4 et 10 p. 100 pour *Magdalena, Montjoie, Flinor* et un échantillon de *Dragon*.

On n'observe pas de modifications de volume pour les variétés *Atys, Splendeur* et deux autres échantillons (*Capitole* et *Cappelle*).

Dans les cas où il y a diminution de volume, le déficit moyen est d'environ 16 p. 100. Avec *Ouest* (28 p. 100) et *Wimax* (33 p. 100), l'action de l'acide ascorbique apparaît particulièrement défavorable. La perte en volume se situe entre 7 et 20 p. 100 pour *Rex, Progress* et deux échantillons de *Wimax* d'autres provenances.

L'addition d'acide ascorbique apparaît donc en définitive particulièrement favorable pour les variétés « faibles ». Son action est assez peu marquée sur la plupart des variétés de force moyenne ou élevée. Elle se révèle, en revanche, nettement défavorable pour certaines variétés d'hiver (*Ouest, Wimax*) ou de printemps (*Progress* et *Rex*).

Lorsque les résultats obtenus avec l'acide ascorbique (apprêt 2 heures 30) sont comparés avec ceux fournis par la formule saccharose (apprêt 3 heures), la proportion des échantillons améliorés passe de 61 à 43 p. 100, celle des échantillons inchangés ou amoindris de 39 à 57 p. 100. Sur cette base, l'accroissement moyen de volume passe de 18 à 27 p. 100 et la diminution moyenne de 16 à 12 p. 100. Dans leur ensemble, les observations précédentes sont confirmées.

d) *Influence de la durée de deuxième fermentation* (apprêt) *sur le volume des pains.*

L'obtention, après une fermentation de 3 heures, d'un pain de volume égal ou supérieur à celui obtenu pour une fermentation de 2 heures 30 est l'indice de propriétés plastiques satisfaisantes, donc d'une bonne tolérance. A l'inverse, la production d'un pain de volume plus faible après 3 heures qu'après 2 heures 30 caractérise les pâtes « non tolérantes » dont les caractéristiques plastiques ne supportent pas un apprêt prolongé.

Sur les 28 échantillons ainsi testés, 20 (soit 72 p. 100) fournissent après 3 heures un pain de volume soit inchangé, soit plus élevé qu'après 2 heures 30 ; 8 seulement (soit 28 p. 100) produisent dans les mêmes conditions un pain de volume plus faible. Ce comportement des pâtes à la cuisson est d'ailleurs plus ou moins marqué selon les variétés.

Sur les 20 échantillons pouvant être qualifiés de *tolérants*, l'accroissement de volume entre 2 heures 30 et 3 heures peut varier de 8 à 24 p. 100 (moyenne 12 p. 100) pour 12 d'entre eux. En voici la liste, par gain de volume décroissant : *Major* 70, *Aronde* 68, *Champlein* 68, *Splendeur* 68, *Major* 70, *Cappelle* 68, *Capitole* 68, *Ouest* 68, *Dragon* 70, *Montjoie* 70, *Flinor* 70, *Capitole 68.*

Le volume du pain demeure inchangé pour les 8 échantillons suivants : *Atys* 69, *Capitole* 69, *Cappelle* 68, *Dragon* 70, *Joss* 68, *Magdalena* 70, *Wimax* 68 et 70.

Les 8 échantillons s'étant révélés *non tolérants* accusent une diminution de volume moyenne de 11 p. 100 (extrême 7 à 23 p. 100). En voici la liste, par perte de volume croissante : *Étoile de Choisy* 68, *Wimax* 70, *Progress* 68, *Major* 70, *Rex* 68 (2 éch.), *Champlein* 68, *Joss* 68.

Ainsi, une proportion importante de variétés peuvent subir un apprêt prolongé sans que le produit de cuisson en soit amoindri. Pour d'autres, au contraire, un apprêt prolongé apparaît défavorable.

Selon leurs caractéristiques culturales (lieu de culture, année de récolte), certaines variétés comme *Joss, Champlein* et *Wimax* peuvent se révéler plus ou moins tolérantes.

e) *Aptitudes boulangères des variétés.*

Compte tenu des observations précédentes, il est possible de dresser la liste des variétés manifestant des aptitudes à la panificationt satisfaisantes pour la boulangerie c'est-à-dire réagissant favorablement à l'acide ascorbique tout en présentant une bonne tolérance à l'apprêt.

Ces variétés, au nombre de 9 sur les 17 examinées (soit 15 échantillons sur 28) figurent dans le tableau 6 ainsi que les volumes moyens des pains obtenus dans les trois conditions des micro-essais, comparativement à ceux relatifs aux essais fournil utilisant le pétrissage intensifié.

En micro-essais, avec addition de saccharose, les volumes des pains sont plus élevés pour un apprêt de 3 heures qu'un de 2 heures 30. La présence d'acide ascorbique pour un apprêt de 2 heures 30 améliore encore le volume dans la majorité des cas, celui fourni par *Montjoie* et *Flinor* restant inchangé.

Des essais actuellement en cours se proposent de préciser la réaction des mêmes variétés à l'acide ascorbique, en présence ou en l'absence de saccharose pour des durées d'apprêt supérieures à 2 heures 30.

Comparativement aux résultats des micro-essais avec acide ascorbique, ceux obtenus en pétrissage intensifié se révèlent supérieurs dans 3 cas (*Cappelle, Major, Aronde*), inférieurs dans 4 cas (*Montjoïe, Dragon, Flinor, Magdalena*) et identiques dans 2 cas (*Capitole* et *Atys*).

TABLEAU 6

Volume moyen des pains obtenus à partir de différentes variétés de blé dans les conditions du pétrissage intensifié et des micro-essais

Variétés	Nbre éch.	Volume moyen des pains (ml/100 g farine)			
		+ sucre 2 h 30	+ sucre 3 h	+ ac. asc. 2 h 30	Pétr. int.
Cappelle	2	588	612	618	778
Major	3	567	617	628	681
Montjoie	1	600	650	650	591
Aronde	1	550	625	675	718
Dragon	2	612	662	695	665
Flinor	1	650	700	700	627
Capitole	3	650	683	717	720
Atys	1	700	700	825	826
Magdalena	1	750	750	825	798

On peut alors admettre que les variétés réagissent au pétrissage intensifié de façon différente qu'elles ne le font vis-à-vis de l'acide ascorbique et que les phénomènes responsables de l'accroissement de volume observé pour les deux procédés sont vraisemblablement eux-mêmes de nature différente.

Il convient enfin de signaler que, conjointement au facteur variétal, le passé cultural des blés conditionne également leur comportement en panification. C'est ce que montrent les exemples suivants empruntés à des échantillons des variétés *Joss* et *Champlein* de même année de récolte mais d'origine culturale différente (tabl. 7).

Les deux échantillons de chaque variété réagissent favorablement à l'acide

TABLEAU 7

Influence de l'origine du blé sur le volume du pain

Variété	Origine	Volume moyen des pains (ml/100 g farine)			
		+ sucre 2 h 30	+ sucre 3 h	+ ac. asc. 2 h 30	Pétris. int.
Joss	La Minière	375	375	500	639
	Versailles	425	325	487	653
Champlein	La Minière	375	425	550	741
	Pontivy	550	425	575	682

ascorbique mais, dans les deux cas, seuls ceux cultivés à La Minière manifestent une bonne tolérance à l'apprêt.

On notera au passage l'écart important entre les volumes obtenus par addition d'acide ascorbique (micro-essais) et par pétrissage intensifié (fournil). Ceci met en évidence l'influence particulièrement favorable de ce dernier traitement au niveau des blés faibles dans les conditions de cette étude.

B. — *Critères indirects d'appréciation*

1. *Tests classiques de contrôle.*

a) *Tests physiques, chimiques et enzymatiques.*

Voici, sous forme condensée, les résultats obtenus à partir des 28 échantillons examinés (tabl. 8).

Des critères tels que le poids de 1 000 grains et la teneur en protides des grains évoluent dans des limites assez étroites et en conséquence différencient relativement peu les échantillons. La faible distribution des teneurs en protides est, de ce point de vue, bien caractéristique de nos productions en blés tendres.

TABLEAU 8

Critères physiques, chimiques et enzymatiques d'appréciation des blés et farines
(tests classiques de contrôle)

	Poids de 1 000 grains (g)	Taux de vitrosité p. 100	Mat. minérales farines (p. 100 s. s.)	Protides grains (N × 5,7) (p. 100 s. s.)	Temps de chute (sec.)
Minimum	35,5	8	0,41	10,7	189
Maximum	50	80	0,74	14,3	453
Moyenne	*43*	*45,6*	*0,54*	*12,6*	*349*
Distribution relative p. 100	± 9,8	± 40	± 14,8	± 9,1	± 19,7

L'échelle s'élargit dans le cas de la teneur en matières minérales des farines, indice de leur pureté au plan industriel, et du temps de chute, test rapide et pratique rendant compte de l'activité α-amylasique des blés et des farines.

C'est en définitive le taux de vitrosité des grains, autre critère concernant le meunier, qui offre la différenciation la plus large entre les échantillons.

b) *Test rhéologique : alvéographe.*

Les différentes données de l'alvéographe, travail de déformation de la pâte (W), indices de gonflement (G) et de ténacité (P) ainsi que le rapport de configuration de la courbe (P/L) ont toujours constitué, pour le meunier et le boulanger, des indications utiles.

Voici l'essentiel des résultats fournis selon le protocole classique (hydratation constante) d'une méthode largement pratiquée dans la plupart des secteurs concernés par la qualité des blés tendres (tabl. 9).

TABLEAU 9

Variation des indices alvéographiques. Essais à hydratation constante
(tests classiques de contrôle)

	W	G	P	P/L
Minimum	63	16,4	26	0,18
Maximum	404	28,4	154	2,40
Moyenne	*214*	*22,1*	*75,7*	*0,29*
Distribution relative p. 100	± 48	± 16	± 53	± 70

Tous ces indices, à l'exception de G, conduisent à une très large différenciation entre les échantillons.

2. *Tests à échelle réduite pour la sélection.*

a) *Tests rhéologiques et physico-chimiques.*

Nous indiquons ci-dessous les résultats concernant respectivement le microfarinographe (grains broyés ou farines), l'indice de sédimentation (farine standards) et la capacité d'absorption (grains broyés) (tabl. 10).

TABLEAU 10

Tests rhéologiques et physico-chimiques d'appréciation des blés
(tests à échelle réduite pour la sélection)

	Microfarinographe			Indice de sédimentation (ml)	Capacité d'absorption p. 100
	Grains		Farines		
	Consistance (UB)	S (cm^2)	Hydratation p. 100		
Minimum	260	2,7	56	17	65
Maximum	830	35,2	80	67	113
Moyenne	*547*	*9,5*	*64,4*	*35,4*	*84,8*
Distribution relative p. 100	± 30	± 68	± 9,6	± 48	± 18

Alors que le taux d'hydratation des farines conduisant à des pâtes de consistance constante présente une amplitude de variation assez faible, les critères consistance et surface pour les pâtes de blé broyé confectionnées à hydratation constante font apparaître une distribution plus élargie.

Pour ces dernières conditions, après examen d'une centaine d'échantillons et en travaillant sur 50 g de grain broyé, LECLERCQ (1961) avait établi que S était associé au W alvéographique par une corrélation significative ($r = + 0{,}90$). Dans nos conditions et sur un nombre plus limité d'échantillons, cette corrélation est également significative, mais à un degré moindre ($r = + 0{,}56$).

Pour ce qui est des deux autres tests faisant appel aux propriétés d'imbibition des protéines, on constate que la méthode de sédimentation fournit une distribution des valeurs plus large que celle utilisant la centrifugation. La capacité d'absorption en milieu acide des moutures entières de grains est, par ailleurs, associée significativement au taux d'hydratation des farines par une corrélation de $r = + 0{,}79$.

b) *Test biochimique. Composition protéique du gluten.*

L'application de la méthode précédemment décrite à des moutures entières de grain a conduit aux résultats suivants exprimant, soit les teneurs en gliadines et gluténines des échantillons (mg N/100 g s.s.), soit l'importance relative de ces deux types de protéines par rapport aux protéines totales (p. 100 de N_T), soit la valeur du rapport gluténines/gliadines (tabl. 11).

TABLEAU II

Composition protéique du gluten. Teneurs en gliadines et en gluténines

	mg N/100 g s. s.		p. 100 N_T		Gluténines / Gliadines
	Glia.	Glut.	Glia.	Glut.	
Minimum	703	642	32,4	29	0,64
Maximum	1 092	1 076	45,5	42,9	1,25
Moyenne	*862*	*800*	*38,8*	*36*	*0,94*
Distribution relative p. 100..	± 13,2	± 13,8	± 8,7	± 8,5	± 16,4

L'ampleur des distributions apparaît la même pour les deux protéines, qu'il s'agisse de leur importance pondérale ou de leurs proportions relatives. Les variations du rapport gluténines/gliadines différencient davantage les échantillons.

C. — *Signification technologique des critères indirects d'appréciation*

L'interprétation statistique des précédents résultats a permis de préciser la signification technologique des différents critères classiques ou miniaturisés examinés en se référant aux données fournies par les essais de cuisson.

Pour chacune des conditions utilisées, pétrissage intensifié pour les essais « fournil », addition d'acide ascorbique ou de saccharose pour les essais miniaturisés, le

critère commun de référence est le volume des pains (ml) rapporté à 100 g de farine telle quelle.

Pour les 28 échantillons étudiés, les limites de signification des corrélations indiquées dans le tableau 12 sont respectivement de 0,37 et 0,48 aux deux niveaux de sécurité 95 p. 100 (italiques) et 99 p. 100 (gras).

En se référant aux essais de cuisson ayant utilisé le pétrissage intensifié, il apparaît qu'aucun des critères classiques d'appréciation, à l'exception du temps de chute, qui exprime essentiellement des caractéristiques enzymatiques, n'est significativement associé au volume du pain. Il en est de même pour les différents microtests, quelle que soit leur nature.

TABLEAU 12

Coefficients de corrélation associant différents tests classiques et micro-tests au volume des pains
(essais fournil et micro-essais)

		Essais fournil	Micro-essais	
		Pétrissage intensifié	+ ac. asc. 2 h 30	+ sucre 2 h 30
Critères classiques	Poids 1 000 grains	0,13	*0,45*	0
	Vitrosité grains	0,20	0,34	0
	Mat. minérales farines	0	0,23	0,30
	Protides grains	0,13	0,33	— 0,02
	Alvéographe W	0,15	**0,48**	**0,67**
	Alvéographe G	0,04	0,02	— *0,47*
	Alvéographe P	0,10	*0,40*	**0,66**
	Alvéographe P/L	0,11	0,21	**0,57**
	Temps de chute	**— 0,83**	**— 0,59**	**0,55**
Microtests	*Microfarinographe*			
	Grains Consistance	0,10	*0,39*	*0,40*
	Grains S	0,33	0,17	**0,54**
	Farines hydratation	0,14	*0,40*	*0,40*
	Indice Zeleny	0,13	**0,58**	**0,50**
	Absorption acide	0,13	**0,53**	**0,48**
	Gliadines p. 100 s. s.	0,20	— 0,01	— 0,24
	Gluténines p. 100 s. s.	0,08	*0,45*	0,27
	Gluténines/Gliadines	— 0,10	*0,42*	*0,41*

Si, en ce qui concerne des critères tels que le poids de 1 000 grains, le taux de vitrosité et la teneur en cendres, davantage associés à des caractéristiques meunières, ces constatations ne surprennent pas, il en va différemment de ceux qui sont couramment utilisés à des fins boulangères.

Le fait qu'aucun des indices fournis par l'alvéographe ne soit en relation avec les résultats de la panification expérimentale confirme toutefois les observations qui ressortaient d'une étude antérieure (Bourdet *et al.*, 1971) ayant utilisé le pétrissage intensifié, alors que, dans les conditions du pétrissage dit normal, les indices W, G et L présentaient des corrélations significatives à 95 p. 100 avec le volume du pain pour deux modes de cuisson (moules et sole).

Les mêmes remarques s'appliquent à la teneur en protides qui ne présentait

pas davantage, comme dans le cas présent, de corrélation significative dans les conditions du pétrissage intensifié, mais qui, au contraire, était associée significativement au volume du pain, pour le procédé de pétrissage normal, que la cuisson soit effectuée en moules ou sur sole.

La seule corrélation significative (et inverse) concernant le temps de chute, mise ici en évidence, pourrait être reliée à celles déjà observées dans les essais antérieurs pour l'indice maltose et l'amylographe, autres formes d'expression de l'activité amylolytique, qui apparaît ainsi comme une caractéristique de qualité boulangère importante dans le cas particulier du pétrissage intensifié.

Quand on prend pour référence les essais de cuisson à échelle réduite, le nombre des critères significativement associés au volume du pain apparaît, en revanche, notablement plus important.

Au niveau des tests courants, ce sont surtout les critères en relation avec les propriétés plastiques (alvéographe) et enzymatiques (temps de chute) qui conduisent à des corrélations significatives. C'est le cas des indices W et P, pour les deux types de micro-essais, auxquels viennent s'adjoindre l'indice de gonflement G (corrélation inverse) et le rapport P/L pour la formule contenant du saccharose.

Le temps de chute est également très significatif pour les deux formules. Dans celle où les seuls sucres fermentescibles sont apportés par la farine (acide ascorbique), la corrélation est négative, comme pour le pétrissage intensifié. Elle devient au contraire positive lorsqu'un apport en sucre fermentescible vient masquer les différences d'activité amylolytique propres aux farines.

Aucune signification n'est mise en évidence dans les autres cas (caractéristiques physiques ou chimiques), exception faite du poids de 1 000 grains avec la formule acide ascorbique.

Au niveau des tests à échelle réduite, qui concernent principalement certaines propriétés rhéologiques et certaines caractéristiques propres aux protéines, plusieurs corrélations significatives sont également mises en évidence.

Les indications fournies par le microfarinographe sur les pâtes de grain broyé (consistance) ou de farine (hydratation) sont significatives à 95 p. 100. Pour l'indice S déterminé sur grain, la corrélation est significative seulement dans le cas des essais avec addition de sucre.

Les propriétés de gonflement des protéines, exprimées par les indices ZELENY et d'absorption acide, apparaissent très représentatives du volume des produits de cuisson obtenus selon les deux formules.

Enfin, et contrairement à la teneur en protéines totales, certaines caractéristiques de composition protéique du gluten apparaissent bien détenir une signification technologique. Si rien n'est mis en évidence pour ce qui est des teneurs en gliadines, et que les teneurs en gluténines ne sont significatives que pour la formule acide ascorbique, on constate que le rapport de ces deux groupes protéiques l'est à 95 p. 100 pour les conditions de l'essai de cuisson miniaturisé.

En définitive, pour les conditions expérimentales mises en œuvre dans cette étude, les critères capables de rendre compte significativement (sécurité 99 p. 100) de la valeur boulangère des blés exprimée par le volume des pains obtenus, varient en nombre et en nature selon la technique de panification pratiquée.

Dans les conditions du pétrissage intensifié utilisées au fournil expérimental, le seul critère significatif est de nature amylolytique (temps de chute).

Dans le cas des essais de cuisson miniaturisés réalisés au laboratoire en présence de deux types d'adjuvants, non seulement la signification de ce critère est confirmée mais également celle du test de contrôle courant (alvéogramme) fondé sur les caractéristiques rhéologiques.

Ces mêmes essais à échelle réduite mettent de plus en évidence la signification d'autres critères, faisant appel à certaines caractéristiques rhéologiques (S microfarinographe) ou aux propriétés d'imbibition des protéines (indices de sédimentation et d'absorption acide) pouvant être mis à profit dans les études de sélection, en raison des faibles quantités de matière première qu'implique leur mise en œuvre.

IV. — CONCLUSIONS

Une constatation particulièrement importante au plan industriel ressort de la présente étude. En se référant au volume des pains obtenus, aucun des critères couramment utilisés en meunerie et en boulangerie, à l'exception du temps de chute, n'apparaît rendre compte du comportement des blés en panification dans les conditions qui sont actuellement celles de la boulangerie française.

Non seulement l'essai de cuisson conçu dans cette optique ne présente pas toutes les caractéristiques de reproductibilité souhaitables, mais il tend à une certaine uniformisation du volume des pains, n'offrant qu'une différenciation très relative entre les divers types de blé. En fait, il constitue actuellement le seul critère significatif utilisable industriellement dans la mesure où les matières premières, blés et farines, ne dépassent pas un certain niveau de « force » et présentent des aptitudes assez voisines.

Si, en revanche, on se réfère aux résultats d'essais de cuisson à plus petite échelle, utilisant des conditions expérimentales sensiblement différentes qui offrent une reproductibilité satisfaisante, on aboutit à des échelles de valeurs notablement plus ouvertes permettant une bonne différenciation des types de blé, allant des plus faibles aux plus forts.

On constate en outre que, dans ces conditions, plusieurs des critères examinés à l'aide de tests classiques ou de microtests sont, à des degrés divers, significativement associés au volume des pains ; c'est en particulier le cas du test rhéologique de l'alvéographe couramment utilisé par l'industrie.

Ces divergences apparentes trouvent leur explication dans le fait que les deux types d'essais de cuisson ne visent pas le même but.

La panification expérimentale au fournil, qui reproduit strictement les conditions de la pratique, cherche seulement à tester la valeur boulangère commerciale des blés et des farines ; or, indépendamment de caractéristiques fermentaires définies, celle-ci concerne une gamme relativement limitée de caractéristiques plastiques, au-delà de laquelle le produit fini se trouve pénalisé. C'est un fait bien connu que la technique française de panification ne peut valablement panifier en l'état des blés de force élevée, mais qu'elle les utilise seulement comme additifs destinés à améliorer les blés trop faibles.

L'essai de cuisson miniaturisé, conçu en tant que méthode réalisable au laboratoire, se propose d'apprécier la force potentielle des lignées en cours de sélection,

caractéristique tributaire du patrimoine génétique. Son domaine d'application concerne donc non seulement la panification mais, de façon plus générale, les divers secteurs d'utilisation des blés tendres.

En éliminant l'influence des caractéristiques fermentaires de nature non génétique, il permet de tester significativement les propriétés plastiques propres à chaque type de blé, et notamment la tolérance des pâtes avant la mise au four, d'une particulière importance en boulangerie. Le fait que l'acide ascorbique, adjuvant couramment utilisé en panification, permette dans la plupart des cas une valorisation de ces propriétés plastiques comparable à celle du pétrissage intensifié, conduit par ailleurs à concevoir un essai de cuisson associant les deux additifs examinés séparément dans cette étude.

C'est dans cette optique que sont actuellement poursuivis nos travaux. Ils visent principalement à définir un essai de cuisson capable d'apprécier spécifiquement les caractéristiques de force intrinsèque des blés et pouvant, aux stades précoces de la sélection, servir de référence à des microtests d'appréciation indirecte, d'emploi simple et rapide, compatible avec des analyses de série.

La détermination alvéographique des caractéristiques plastiques des blés, qui a constitué au cours des dernières décennies le test de base des programmes de sélection en France, mais qui ne peut intervenir qu'à un stade déjà avancé en raison des quantités de matériel qu'elle réclame, ne détient plus désormais, avec l'évolution des technologies, la signification qui lui était attribuée du seul point de vue boulanger.

D'où l'intérêt que présenterait pour la sélection un test de référence rendant compte spécifiquement des aptitudes plastiques des blés dans les conditions d'évolution des pâtes conduisant à la cuisson, contrairement au critère rhéologique classique qui exprime seulement ces caractéristiques plastiques aux tous premiers stades de la préparation d'une pâte non soumise aux transformations fermentaires.

On peut d'ailleurs concevoir que l'intérêt d'un tel essai de référence ne se limiterait pas seulement au seul secteur de la sélection. De réalisation moins lourde et plus aisée que l'essai fournil actuel, il peut être conduit, comme toute méthode de laboratoire, dans des conditions parfaitement contrôlées. Offrant une bonne reproductibilité, il permet un contrôle strict des différents paramètres expérimentaux et une exploitation significative des résultats obtenus.

Il pourrait donc être également mis à profit par les producteurs dans l'évaluation des nouvelles variétés et l'appréciation des récoltes, par les meuniers pour tester les lots réceptionnés et assurer la production de farines de propriétés uniformes et constantes, par les boulangers enfin pour déterminer les meilleures conditions de travail permettant d'obtenir le meilleur produit.

Reçu pour publication en octobre 1972.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements aux divers organismes qui, à des titres divers dans le cadre de l'action concertée précitée, ont aidé à la réalisation de ce travail : à la Station d'Amélioration des Plantes de l'I. N. R. A. au C. N. R. A. et à l'Association professionnelle pour l'Amélioration

des Plantes (A. P. A. P.) pour la préparation et la fourniture des matériels d'étude, à la Société A. R. I. A. des Grands Moulins de Paris pour la préparation des farines industrielles, à l'École nationale supérieure de Meunerie et des Industries céréalières pour la réalisation des essais de cuisson au fournil expérimental.

SUMMARY

INDUSTRIAL AND BREEDING CRITERIA USED FOR ASSESSING THE BAKING QUALITY OF SOFT WHEATS

The baking value determination of 28 samples of wheat, highly differenciated by their rheological characteristics, was undertaken either directly with baking tests, or indirectly by several methods, some commonly used in industrial control, others made suitable for low quantities of grain.

The baking tests were carried out according to two methods : one, requiring 2 kg flour, is performed according to the french process using over-mixing ; the other, perfected for the laboratory, requires only 40 g flour, ascorbic acid or sucrose being added.

The reproducibility of each baking process is discussed and the effects on bread volume of mechanical or chemical treatment of doughs as their fermentation tolerance before baking are compared.

Mention is made of the distribution, between types of wheat, of the various classical tests (1 000 grains weight, vitreousness index, ash and protein content, falling number, alveogram) and the microtests liable to be used in breeding (microfarinograph on wheat meal and flours, sedimentation value and water retention capacity, composition of gluten proteins in gliadin and glutenin).

The results from both baking processes are compared and correlations between bread volumes from both conditions and the various indirect tests used are calculated.

Discussion is presented about the technological meaning of common methods used in the industry and the microtests more particularly intented for breeding studies. The interest of a microbaking test, used as a reference at this stage to appreciate the technological potentialities of wheats, is emphasized.

RESUMEN

CRITERIOS INDUSTRIALES Y CRITERIOS DE SELECCION PARA LA APRECIACION DEL VALOR DE UTILIZACION DE LOS TRIGOS CANDEALES

Con objeto de apreciar el valor de panificación de distintos tipos de trigo candeal, se ha procedido a ensayos de cocción, ya sea directamente, o bien indirectamente, por aplicación de distintos métodos físicos, químicos, reológicos y enzimáticos, relativos, algunos de los mismos, al control industrial convencional, mientras que otros han sido adaptados especialmente a cantidades reducidas de material.

Han sido utilizados dos tipos de enzayos de cocción, el primero realizado en un horno experimental mediante 2 kg de harina según la técnica francesa de amasado intensificado, y el otro relativo a una prueba de laboratorio a escala reducida, utilizándose únicamente 40 g de harina.

Después de haberse precisado cómo se reparten, entre los distintos trigos, los valores indicados por las distintas pruebas directas o indirectas, se procede a la comparación de la influencia ejercida respecto al volumen de los panes por un tratamiento mecánico o químico de las pastas y se entra en materia respecto a su « tolerancia » antes de la hornada.

Los resultados proporcionados por ambos métodos de cocción son comparados y se presentan las correlaciones en que se integran significativamente o no las distintas pruebas indirectas al volumen de los panes obtenidos según cada procedimiento.

Finalmente, se entra en materia respecto a la significación tecnológica que convienne atribuir a los criterios industriales convencionales y a las micropruebas destinadas a la selección, y se hace patente el interés que presentaría, a este nivel, una microprueba de cocción destinada a servir de referencia para apreciar de forma más general el potencial tecnológico de los trigos.

RIASSUNTO

CRITERI INDUSTRIALI E CRITERI DI SELEZIONE PER APPREZZARE IL VALORE D'IMPIEGO DEL GRANO TENERO

L'apprezzamento del valore di diversi tipi di grano tenero in panetteria è stato effettuato sia direttamente mediante delle prove di cottura sia indirettamente mediante diversi metodi fisici, chimici, reologici e enzimatici ; gli uni si rifanno al controllo industriale classico, gli altri sono particolarmente adattati a piccole quantitá di materiale.

Sono stati effettuati due tipi di prove ; il primo eseguito in forno esperimentale su 2 kg di farina secondo la tecnica francese di impastatura intensificata e il secondo è una prova di laboratorio su scala ridotta che utilizza soltanto 40 g di farina.

Dopo aver precisato come si suddividevano, tra i vari tipi di grano, i valori forniti dalle diverse prove direte o indirette, si confronta l'influenza esercitata sul volume dei pani mediante un trattamento meccanico o chimico della pasta e viene discussa la loro « tolleranza » prima della messa in forno.

Vengono confrontati i risultati dati dai due metodi di cottura e vengono presentati correlazioni che associano in modo significativo o no le varie prove indirette al volume delle pani ottenuti secondo ogni procedimento.

Si discute infine sul significato tecnologico che bisogna attribuire ai criteri industriali classici e alle microprove destinate alla selezione. Viene sottolineato l'interesse che, a questo livello, presenterebbe una microprova di cottura che potrebbe servire come riferimento per apprezzare in modo più generale il potenziale tecnologico del grano.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

B. I. P. E. A. (Bureau interprofessionnel d'Études analytiques). Groupe de travail « Essais de Panification ». Circuits d'analyses avril 1970 à janvier 1972 (non publié).

Bourdet A., 1966. Influence des conditions de production, de récolte et de stockage sur la composition biochimique des céréales. III. Azote total et protéines. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **20** (2), 177-219.

Bourdet A., Berrier R., Leclercq J.-R., 1971. Signification technologique des critères dont dispose la sélection pour apprécier l'aptitude boulangère des variétés nouvelles. *La Meunerie franç.*, (275), 9-19 ; (276), 27-37.

Bourdet A., Berrier R., 1972. La panification expérimentale au fournil et au laboratoire dans l'appréciation des blés tendres. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, (1), 65-74.

C. N. C. E. R. N. A., 1969 (Centre national de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation). Commission des Industries des Céréales. Groupe « Essais de Panification ». Méthode directe, pétrissage intensifié (non publié).

Feillet P., 1965. *Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques.* Thèse de Docteur-Ingénieur, Paris. *Ann. Technol. agric.*, **14** (4-5), 94 p.

Finney K. F., Yamazaki W. T., 1946. Water retention capacity as an index of the loaf volume potentialities and protein quality of hard red winter wheats. *Cereal Chem.*, **23**, 416-427.

Leclercq J.-R., 1961. La force boulangère des blés et son appréciation au cours de la sélection. *Ann. Technol. agric.*, **10** (3), 257-288.

Mauze C., Richard M., Scotti G., 1972. *Guide pratique du Contrôle de la Qualité des Blés.* Institut technique des Céréales et des Fourrages. Janvier, 176 p.

Pinckney A. J., Greenaway W. T., Zeleny L., 1957. Further developments in the sedimentation tests for wheat quality. *Cereal Chem.*, **34**, 16-25.

Zeleny L., 1947. A simple sedimentation test for estimating the bread baking and gluten qualities of wheat flour. *Cereal Chem.*, **24**, 465-475.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (2), 183-198.

ÉTUDE DE LABORATOIRE SUR LES POSSIBILITÉS D'ÉPURATION DES VINASSES DES DISTILLERIES VINICOLES PAR LE CHARBON ACTIF ET PAR LA CHAUX

J. MOURGUES et J. MAUGENET
avec la collaboration technique de P. BARDOU

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A.
11104 Narbonne

RÉSUMÉ

Des essais d'épuration physico-chimique ont été réalisés en vue de tester les possibilités d'élimination des composés phénoliques des vinasses avant un traitement biologique. Le charbon actif et la chaux éliminent la plus grande partie de ces composés et augmentent le rapport $\frac{DBO_5}{DCO}$ de l'effluent sauf pour les vinasses de vins blancs. Ces traitements présentent des inconvénients : charbon actif valable surtout pour les vinasses de vins rouges peu répandues, volume important de boues difficiles à floculer avec la chaux. Les auteurs s'orientent vers d'autres prétraitements (récupération des tartrates sur tous les effluents et des levures dans les vinasses de lies) précédant une épuration biologique par une flore adaptée.

Mots clés : *eaux résiduaires, épuration physico-chimique, phénols, vinasses.*

I. — INTRODUCTION

Dans un mémoire précédent (MOURGUES, MAUGENET, 1969) on a signalé que les composés phénoliques des vinasses étaient difficilement biodégradables. Avant d'entreprendre une étude sur la sélection de microorganismes adaptés à la métabolisation de ces constituants, on a voulu chiffrer au laboratoire les possibilités d'élimination de ces composés par des moyens physico-chimiques.

Le traitement par charbon actif est l'un de ces moyens. C'est ainsi qu'il a été utilisé par MERCER (1970) pour l'épuration des saumures d'olives de table et par SODERQUIST (1971) pour celle des solutions sulfitiques de décoloration des cerises en conserve. Ces deux types d'eaux ainsi traitées peuvent être recyclés en vue de diminuer la pollution. Aucune application n'est signalée dans la littérature au sujet des effluents vinicoles.

L'épuration chimique par la chaux a été appliquée, par contre, aux vinasses de vins rouges par FLANZY (1936). Elle permet l'élimination des matières colorantes et tannoïdes, de l'acide tartrique, des substances azotées, des phosphates, des gommes et des pectines, soit environ 27 p. 100 de la matière organique dissoute. Très peu d'applications pratiques ont été faites. Il n'en est pas de même pour le traitement des cidrasses par la chaux préconisé par WARCOLLIER et TAVERNIER (1939) et repris par TOURLIÈRE (1954).

Plus récemment, SOEIRO et LINARES DE LIMA (1960) ont proposé de traiter les vinasses de distilleries vinicoles par la chaux vive à la dose de 10 kg/m³ avant d'effectuer un traitement biologique sur filtre bactérien. Enfin, en 1971, un brevet a été pris pour le traitement des effluents des distilleries vinicoles par la chaux suivi d'un passage sur filtre à hydroanthracite ou à charbon actif (ARDERE FRANCE OSSEN S. A., 1969).

On a donc repris au laboratoire l'étude de l'épuration des vinasses des distilleries vinicoles par le charbon actif et la chaux comme moyen d'éliminer les composés phénoliques en vue de favoriser une épuration biologique ultérieure. On a également voulu voir si le traitement à la chaux ne favorisait pas l'élimination des matières en suspension des vinasses de lies.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Les vinasses utilisées proviennent des distilleries du Languedoc-Roussillon (Aude, Hérault, Pyrénées-Orientales), de la région de Cognac (Charente) et d'Armagnac (Gers). Pour préparer quelques vinasses de vins rouges et blancs, on a utilisé un petit alambic en cuivre Barbet chauffé à feu nu permettant de passer quatre litres de vin. Les vinasses correspondantes sont signalées dans les tableaux par la lettre (L).

Plusieurs produits ont été utilisés : acticarbone S en poudre (C.E.C.A.) sélectionné précédemment au laboratoire pour décolorer les vins avant le dosage rapide des sucres, carbonate de calcium industriel, chaux vive technique, chaux éteinte (fleur de chaux ventilée industrielle), sulfate ferreux technique, adjuvants de floculation organique de synthèse de type anionique (Purifloc A 22 et A 23 de la Dow Chemical Company).

Les essais ont porté sur des volumes de un litre de vinasses avec agitation par barreau magnétique durant une demi-heure pour les traitements au charbon actif, une heure pour la chaux et pour le mélange chaux-sulfate ferreux.

Les analyses ont été faites sur les vinasses décantées dans le cas du traitement à la chaux, filtrées dans le cas du traitement au charbon afin d'éliminer les particules fines de charbon pouvant rester en suspension.

Les composés phénoliques ont été déterminés par la méthode de PRO (1952) avec étalonnage en acide gallique (SINGLETON et ROSSI, 1965), la demande chimique en oxygène (DCO) par la méthode rapide de JERIS (1967), la demande biochimique en oxygène (DBO_5) par la méthode normalisée AFNOR (1969), l'acide tartrique par la méthode MOURGUES et MAUGENET (1972), les matières en suspension totales (MEST) des vinasses de lies par centrifugation et pesée du culot non lavé, séché à 105°C jusqu'à poids constant.

III. — RÉSULTATS

A. — *Épuration par le charbon actif*

1. *Vinasses de vins rouges.*

Le charbon à la dose de 20 et 15 g/l permet d'éliminer respectivement pour les deux échantillons traités 25 et 23 p. 100 de la DCO ainsi que 95 et 70 p. 100 des polyphénols (tabl. 1). Les vinasses sont décolorées complètement à partir de 20 g de charbon par litre.

Les quantités de DCO et de polyphénols adsorbés par gramme de charbon varient respectivement de 324 à 647 et de 41 à 85 (tabl. 1).

Le pH des vinasses paraît convenir puisque l'adsorption des composés phénoliques diminue sensiblement en milieu alcalin.

L'isotherme d'adsorption des polyphénols, représentant en coordonnées logarithmiques la quantité de polyphénols adsorbés par gramme de charbon et les polyphénols restants, est une droite (fig. 1).

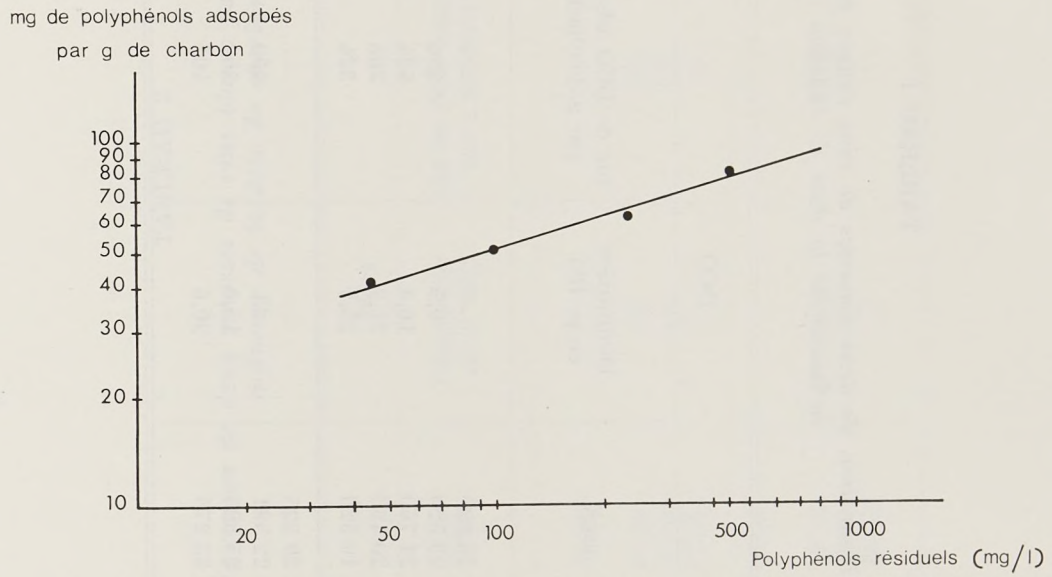


FIG. 1. — *Isotherme d'adsorption des polyphénols d'une vinasse de vin rouge par le charbon actif*

L'élimination des composés phénoliques augmente la biodégradatilité des vinasses ; c'est ainsi que le rapport $\frac{DBO_5}{DCO}$ passe de 0,577 à 0,720 pour la vinasse n° 1 traitée par 20 g de charbon par litre.

2. *Vinasses de vins blancs.*

La diminution de la DCO est beaucoup plus faible que précédemment (de 5 à 5,7 p. 100) à cause de la faible teneur de ces vinasses en polyphénols ; ces derniers diminuent au cours du traitement de 78 à 83 p. 100 et la quantité de charbon utilisée est inférieure de moitié (tabl. 2).

TABLEAU I

Épuration de deux vinasses de vins rouges par le charbon actif : influence de la dose de charbon et du pH

	DCO			Polyphénols		
	mg/l	Diminution en p. 100	mg de DCO adsorbés par g de charbon	mg/l	Diminution en p. 100	mg de polyphénols adsorbés par g de charbon
Vinasse n° 1 (L) pH 3,6	26 000	—	—	867	—	—
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 5	23 520	9,5	496	444	48,8	85
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 10	21 760	16,3	424	228	73,7	64
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 15	20 480	21,2	368	100	88,5	51
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 20	19 520	25,9	324	44	94,9	41
Vinasse n° 2 pH 3,3	29 325	—	—	1 220	—	—
Addition de charbon (15 g/l) pH 3,3	22 581	23	450	366	70	57
Addition de charbon (15 g/l) pH 7,0	25 525	13,0	253	391	67,9	55
Addition de charbon (15 g/l) pH 10,0	23 275	20,6	403	705	42,2	34

TABLEAU 2

Épuration de deux vinasses de vins blancs par le charbon actif : influence de la dose de charbon

	DCO			Polyphénols		
	mg/l	Diminution en p. 100	mg de DCO adsorbés par g de charbon	mg/l	Diminution en p. 100	mg de polyphénols adsorbés par g de charbon
Vinasse de vin blanc (L) pH 3,4	30 200	—	—	415	—	
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 3...	—	—	—	225	36,9	63
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 5...	29 294	3,0	181	150	63,8	53
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 10...	28 811	4,6	139	80	80,7	33
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 15...	28 690	5	100	70	83,1	23
Vinasse de Cognac détartrée pH 4,7...	19 580			254	—	—
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 1...	—	—	—	195	23,2	59
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 3...	19 100	2,4	160	110	56,7	48
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 5...	18 940	3,3	128	72	71,6	36
Quant. de charbon ajoutée (g/l) 10...	18 460	5,7	112	55	78,3	15

Les vinasses ne sont pas entièrement décolorées ; elles restent légèrement verdâtres.

Les quantités de DCO et de polyphénols adsorbés par gramme de charbon sont plus faibles et varient respectivement de 112 à 340 et de 25 à 59.

L'isotherme d'adsorption (fig. 2) présente une cassure, ce qui indique l'existence de deux séries de composés phénoliques adsorbés différemment par le charbon.

La biodégradabilité des vinasses traitées et non traitées est voisine.

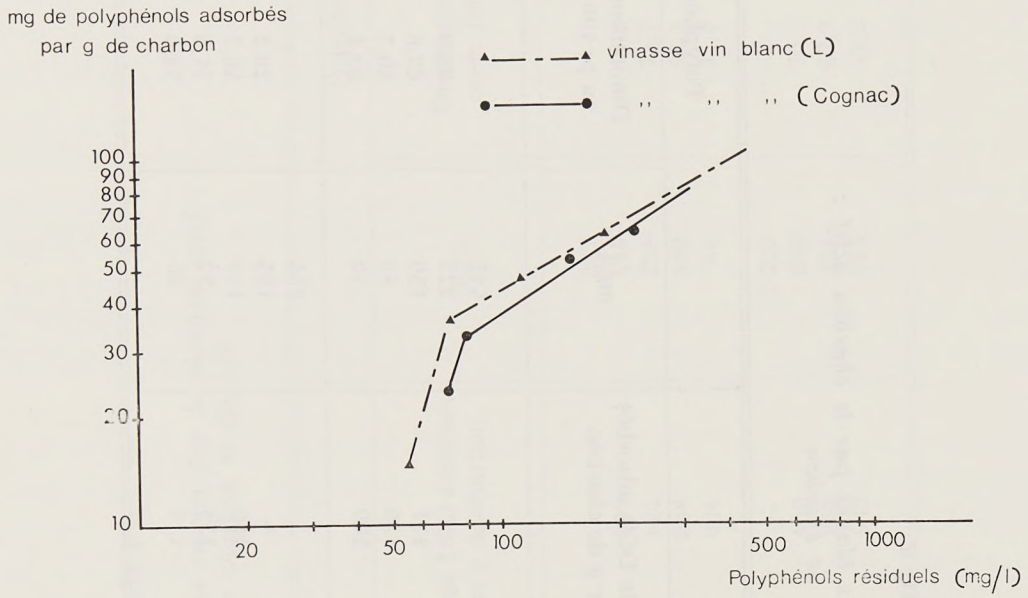


FIG. 2. — *Isotherme d'adsorption des polyphénols de deux vinasses de vins blancs par le charbon actif*

3. *Possibilités d'application aux autres types de vinasses.*

Étant donné que les vinasses de piquettes et de lies débarrassées des matières en suspension ont une teneur en composés phénoliques intermédiaire entre les vinasses de vins rouges et de vins blancs, les possibilités d'épuration seront intermédiaires entre celles obtenues pour les vinasses de vins rouges et de vins blancs.

B. — *Épuration par la chaux*

1. *Vinasses de vins rouges.*

Le carbonate de calcium est à rejeter car il élimine seulement l'acide tartrique et n'a que très peu d'action sur les polyphénols (tabl. 3) ; malgré un excès de carbonate, il est difficile de dépasser un pH de 5,4 ; ceci est d'ailleurs conforme aux observations de JAULMES (1951). Ce sel est à utiliser uniquement pour la récupération industrielle du tartrate de calcium.

La chaux permet, par contre, d'éliminer de 15 à 20 p. 100 de la DCO et 80 p. 100 des polyphénols, mais à condition d'arriver à des pH supérieurs à 11 (tabl. 3). Ces pH sont obtenus en ajoutant 10 g de chaux vive ou 13 g de fleur de chaux. L'élimination des matières organiques en solutions paraît plus poussée à température ambiante qu'à température plus élevée (60°C) ; ce fait a été également observé pour les cidrasses (WARCOLLIER et TAVERNIER, 1939).

L'effluent traité est jaune d'or ; lorsque l'on revient en milieu acide la coloration

TABLEAU 3

Épuration de vinasses de vins rouges par le carbonate de calcium, la chaux vive, la chaux éteinte

	pH	DCO		Polyphénols		Couleur du surnageant	Volume des boues en ml/l après un jour de repos
		mg/l	Diminution en p. 100	mg/l	Diminution en p. 100		
Vinasse de vin n° 1	3,6	24 000	—	939	—	rouge	—
Addition de 9 g/l de $CaCO_3$	5,4	22 800	5	890	5,2	gris-violet	10
Addition de CaO (g/l) 3	7,8	21 440	10,7	305	67,5	noirâtre	62
Addition de CaO (g/l) 5	9,8	21 600	10,0	211	77,5	noirâtre	208
Addition de CaO (g/l) 7,5	11,0	21 280	11,3	200	78,7	jaune	208
Addition de CaO (g/l) 10	12,0	19 200	20,0	186	80,2	jaune	250
Vinasse de vin (L) n° 2	3,1	43 700	—	1 650	—	rouge	—
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 7	6,7	39 975	8,5	635	61,5	noirâtre	80
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 10	10,5	39 775	9,0	377	77,1	acajou	200
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 13 à 60°C	11,3	37 825	13,4	325	80,3	jaune	220
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 13 à 20°C	11,4	37 025	15,2	330	80,0	jaune	240
Vinasse vin (L) n° 3	3,4	32 000	—	1 120	—	rouge	—
Addition de 10 g de Ca O/l	12	24 240	24,2	203	82,0	jaune	260

rouge ne réapparaît plus. Le volume des boues est important et représente après un jour de repos 25 p. 100 du volume de vinasse de vin.

Les floculants organiques anioniques comme le Purifloc A 22 et surtout le A 23 permettent d'accélérer la vitesse de sédimentation des boues, comme le montre la figure 3. Ces polymères agissent à dose très faible (1,5 mg/l).

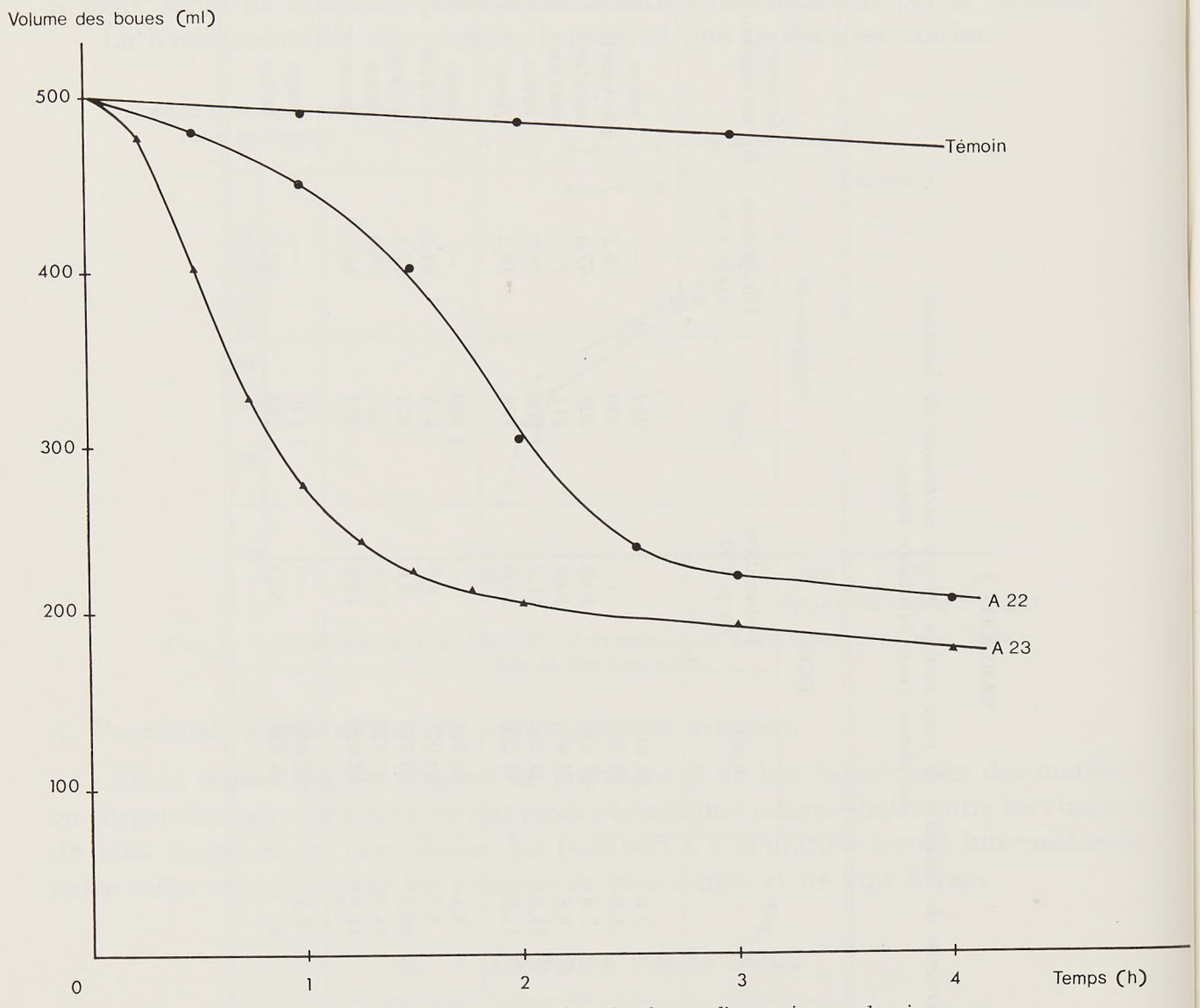


FIG. 3. — *Courbe de sédimentation des boues d'une vinasse de vin rouge traitée par la chaux vive* (10 g/l) *et additionnée de Purifloc A22 et A23* (1,5 mg/l)

Nous avons abandonné le traitement à la chaux combiné à d'autres sels : sulfate ferreux, chlorure ferrique,... car les résultats ne sont pas supérieurs à ceux obtenus avec la chaux seule ; le surnageant est cependant plus limpide.

Le traitement à la chaux augmente légèrement la biodégradabilité des vinasses ; le rapport $\frac{DBO_5}{DCO}$ passe de 0,510 à 0,623 pour la première vinasse testée.

2. *Vinasses de vins blancs.*

La diminution de la DCO et des polyphénols est plus faible que dans le cas des vinasses de vins rouges puisqu'elle varie respectivement de 7 à 22 p. 100 et de 11 à 59 p. 100 (tabl. 4).

TABLEAU 4

Épuration de vinasses de vins blancs par la chaux éteinte

	pH	DCO		Polyphénols		Couleur	Volume des boues en ml/l après une nuit de repos
		mg/l	Diminution en p. 100	mg/l	Diminution en p. 100		
Vinasse vin blanc (L)	3,5	33 900	—	365	—	jaune	—
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 4	9,0	32 725	3,0	265	27,4	noirâtre	250
6	11,2	32 725	3,0	177	51,5	jaune foncé	350
8	11,7	30 266	10,7	175	52,0	—	350
12	11,7	29 200	13,9	175	52,0	—	300
16	11,9	29 160	14,0	182	50,1	—	300
20	12,1	26 340	22,3	148	59,4	—	400
Vinasse de Cognac contenant 6 g d'acide tartrique par litre	3,3	30 753	—	350	—	jaune-vert	
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 3,75	4,5	27 645	10,1	—	—	jaune-vert	25
5,00	6,5	27 154	11,7	—	—	grisâtre	30
5,60	8,2	26 990	12,2	320	8,6	noirâtre	200
6,25	10,2	27 046	12,0	310	11,4	jaune foncé	245
Vinasse d'Armagnac	3,4	27 840	—	260	—	jaune	—
Addition de 10 g/l de $Ca(OH)_2$	11,8	25 878	7,0	117	55	jaune foncé	260

Lorsque les vinasses sont riches en sels tartriques, comme dans la région de Cognac (vins distillés avec leurs lies), la récupération de ces sels sous forme de tartrate de calcium permet d'éliminer 10 p. 100 de la DCO. Lorsqu'on augmente la quantité de chaux ajoutée, la DCO diminue peu et il aurait fallu atteindre un pH supérieur à 11 pour avoir une épuration plus nette.

Lorsque le pH atteint après addition de chaux augmente de 7 à 11, la coloration des vinasses passe du noirâtre au jaune clair. Le volume des boues est très important comme pour les vinasses de vins rouges.

3. *Vinasses de piquettes.*

Au cours du traitement, la DCO diminue de 19 à 42 p. 100 et les polyphénols de 77 à 85 p. 100 (tabl. 5).

Les résultats sont meilleurs que ceux observés avec les vinasses de vins rouges ; les vinasses de piquettes sont plus riches en sels tartriques (2,5 à 5 g/l en acide tartrique contre moins de 2,5 g pour les vinasses de vins rouges). Elles contiennent également des gommes et des pectines ainsi que quelques matières en suspension.

La diminution de la DCO la plus élevée (42 p. 100) a été observée sur une vinasse de piquette prélevée dans un bassin de recyclage et ayant subi un début d'altération microbiologique.

4. *Vinasses de lies.*

Les essais ont été effectués sur es deux types de vinasses de lies que l'on rencontre industriellement.

Dans les distilleries importantes, les vinasses de lies sont tamisées et détartrées à la sortie des colonnes de distillation par des installations Frilli ou Padovan. Elles contiennent essentiellement des levures en suspension et sont diluées avec un égal volume d'eau au cours du détartrage. Leur pH est compris entre 4,8 et 5,4.

Dans les autres distilleries, les lies sont tamisées et essorées avant distillation ; les vinasses de lies de ce type contiennent des levures, des débris végétaux fins et une petite quantité de tartrates en suspension. Leur pH est en moyenne de 3,6.

Le traitement à la chaux éteinte à la dose de 10 et 13 g/l permet d'éliminer dans ces deux types de vinasses 14 et 17 p. 100 de la DCO soluble ainsi que 67 et 68 p. 100 des composés phénoliques. L'addition de chaux permet d'accélérer la sédimentation des boues uniquement pour la vinasse de lie essorée avant distillation contenant 21 g de matières en suspension par litre (fig. 4). L'inverse se produit pour la vinasse de lie détartrée après distillation qui contient moins de matières en suspension (12,75 g/l). L'addition de floculant anionique A 23 augmente la vitesse de sédimentation des boues, mais le volume de ces dernières est encore supérieur à celui des vinasses non traitées à la chaux (fig. 5).

Les surnageants des vinasses de lies après traitement à la chaux sont toujours troubles. Le sulfate ferreux ajouté en poids égal à celui de la chaux éteinte permet d'assurer la limpidité du surnageant ; il faut arriver cependant, comme pour la chaux seule, à des pH supérieurs à 10. La diminution de la DCO soluble et des polyphénols est plus importante (21 et 24 p. 100 comme l'indique le tableau 6). Par contre, le volume des boues est plus grand (fig. 4).

TABLEAU 5

Épuration de vinasses de piquettes par la chaux vive à la dose de 10 g/l

Échantillons n°	pH		DCO en mg O_2/l			Polyphénols en mg O_2/l		
	Avant épuration	Après épuration	Avant épuration	Après épuration	Diminution en p. 100	Avant épuration	Après épuration	Diminution en p. 100
1	3,55	11,82	18 357	12 654	31,1	750	111	85,2
2	3,52	11,72	17 500	13 105	25,1	780	135	82,7
3	3,58	11,70	19 968	15 475	22,5	680	133	80,4
4	3,50	11,78	20 753	12 105	41,7	920	166	82,0
5	3,65	11,80	30 950	25 000	19,2	880	205	76,7

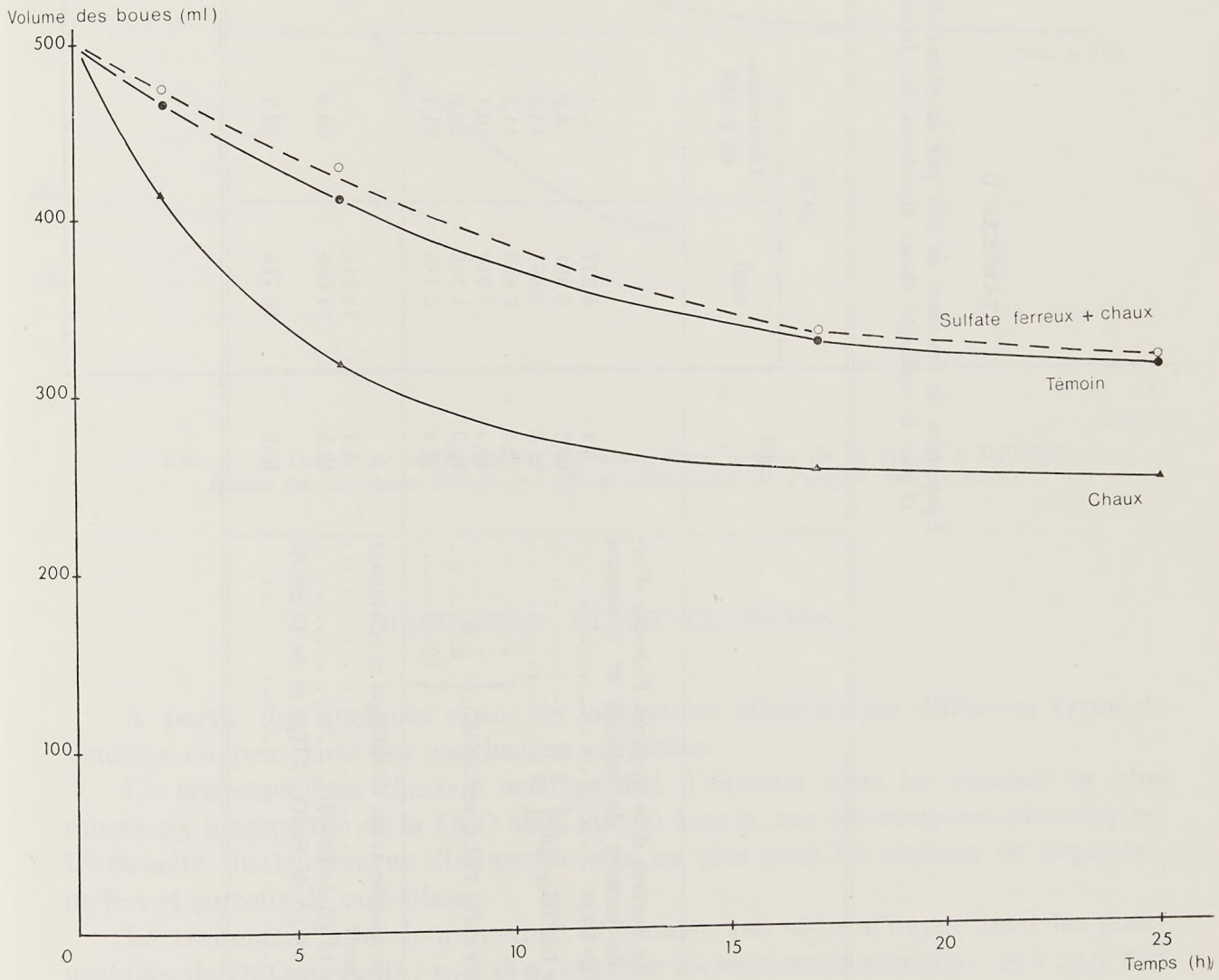


FIG. 4. — *Courbe de sédimentation des boues d'une vinasse de lie* (21 g MEST/l) *traitée par la chaux éteinte* (13 g/l) *et par le mélange sulfate ferreux* (13 g/l) *— chaux éteinte* (13 g/l).

TABLEAU 6

Épuration de vinasses de lies par la chaux éteinte et par le mélange chaux éteinte-sulfate ferreux

	pH	DCO		Polyphénols		Limpidité et couleur du surnageant
		mg/l	Diminution en p. 100	mg/l	Diminution en p. 100	
Vinasse de lie sortant d'un appareil Padovan d'extraction de tartrate de calcium et contenant 12,75 g/l de MEST	5,1	6 577	—	365	—	trouble, sensiblement violacé
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 8	12,2	5 991	8,9	140	61,6	trouble, jaunâtre
Addition de $Ca(OH)_2$ (g/l) 10	12,3	5 667	13,8	120	67,1	trouble, jaunâtre
Addition de $FeSO_4$, 7 H_2O et $Ca(OH)_2$ 2	9,3	5 828	11,3	150	58,9	trouble, violacé
Addition de $FeSO_4$, 7 H_2O et $Ca(OH)_2$ 4	10,5	5 910	10,1	120	67,1	trouble, jaunâtre
Addition de $FeSO_4$, 7 H_2O et $Ca(OH)_2$ 8	12,0	4 736	28,0	102	72,0	limpide, jaune
Addition de $FeSO_4$, 7 H_2O et $Ca(OH)_2$ 10	12,3	5 186	21,1	80	78,0	limpide, jaune clair
Vinasse de lie essorée avant distillation et contenant 21 g/l de MEST	4,1	14 045	—	850	—	trouble, rougeâtre
Addition de 13 g/l de $Ca(OH)_2$	12,4	11 665	16,9	269	68,4	trouble, jaune
Addition de 13 g/l de $FeSO_4$, 7 H_2O et de 13 g/l de $Ca(OH)_2$	10,6	10 715	23,7	177	79,2	limpide, jaune

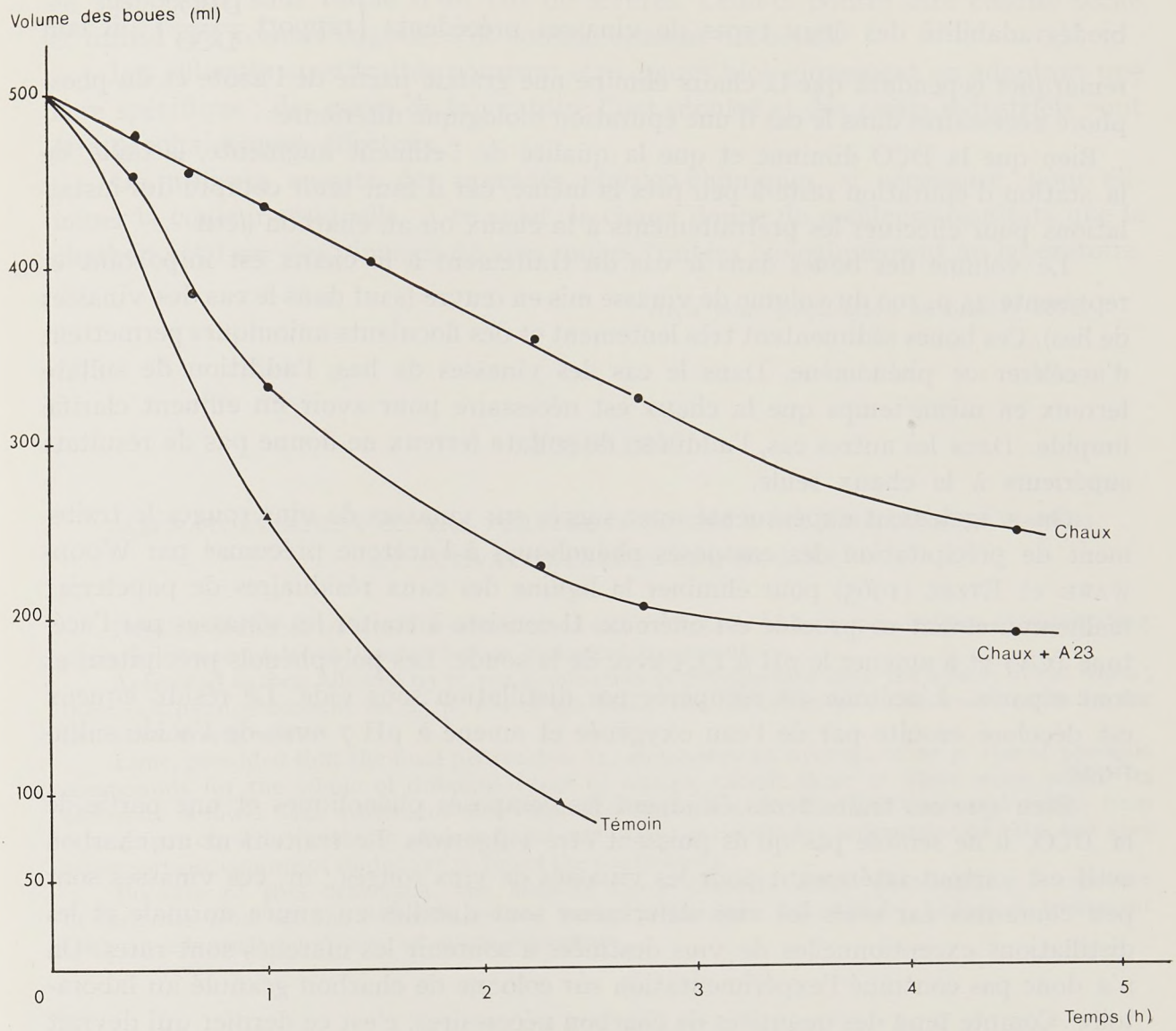


FIG. 5. — *Courbe de sédimentation des boues d'une vinasse de lie* (12,75 g MEST/l) *traitée par la chaux éteinte* (10 g/l) *et additionnée de Purifloc A23* (3 mg/l)

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A partir des quelques essais de laboratoire effectués sur différents types de vinasses on peut tirer les conclusions suivantes.

Le traitement au charbon actif permet d'éliminer dans les vinasses de vins rouges 23 à 25 p. 100 de la DCO ainsi que 70 à 95 p. 100 des composés phénoliques. L'efficacité du traitement diminue de plus en plus pour les vinasses de piquettes, de lies et surtout de vins blancs.

Le traitement à la chaux permet d'éliminer, par ordre d'importance, les pourcentages de DCO suivants : 19 à 42 p. 100 pour les vinasses de piquettes, 15 à 27 p. 100 pour les vinasses de vins rouges, 14 à 27 p. 100 pour les vinasses de lies, 7 à 22 p. 100 pour les vinasses de vins blancs. Les composés phénoliques diminuent fortement dans les vinasses de vins rouges et de piquettes. L'élimination de ces corps augmente la

biodégradabilité des deux types de vinasses précédents $\left(\text{rapport } \frac{DBO_5}{DCO}\right)$; il faut remarquer cependant que la chaux élimine une grande partie de l'azote et du phosphore nécessaires dans le cas d'une épuration biologique ultérieure.

Bien que la DCO diminue et que la qualité de l'effluent augmente, la taille de la station d'épuration reste à peu près la même, car il faut tenir compte des installations pour effectuer les prétraitements à la chaux ou au charbon actif.

Le volume des boues dans le cas du traitement à la chaux est important et représente 25 p. 100 du volume de vinasse mis en œuvre (sauf dans le cas des vinasses de lies). Ces boues sédimentent très lentement et des floculants anioniques permettent d'accélérer ce phénomène. Dans le cas des vinasses de lies, l'addition de sulfate ferreux en même temps que la chaux est nécessaire pour avoir un effluent clarifié limpide. Dans les autres cas, l'addition de sulfate ferreux ne donne pas de résultats supérieurs à la chaux seule.

On a également expérimenté avec succès sur vinasses de vins rouges le traitement de précipitation des composés phénoliques à l'acétone préconisé par Woodward et Etzel (1965) pour éliminer la lignine des eaux résiduaires de papeterie ; malheureusement ce procédé est onéreux. Il consiste à traiter les vinasses par l'acétone (v/v) et à amener le pH à 13,5 avec de la soude. Les polyphénols précipitent et sont séparés. L'acétone est récupérée par distillation sous vide. Le résidu aqueux est décoloré ensuite par de l'eau oxygénée et amené à pH 7 avec de l'acide sulfurique.

Bien que ces traitements éliminent les composés phénoliques et une partie de la DCO, il ne semble pas qu'ils puissent être vulgarisés. Le traitement au charbon actif est surtout intéressant pour les vinasses de vins rouges ; or, ces vinasses sont peu courantes car seuls les vins défectueux sont distillés en année normale et les distillations exceptionnelles de vins destinées à soutenir les marchés sont rares. On n'a donc pas continué l'expérimentation sur colonne de charbon granulé au laboratoire. Compte tenu des quantités de charbon nécessaires, c'est ce dernier qui devrait être utilisé afin de pouvoir le régénérer thermiquement pour diminuer le coût du traitement.

Le traitement à la chaux qui précipite les composés phénoliques et l'acide tartrique est le plus actif sur les vinasses de piquettes ; il donne cependant un volume important de boues difficiles à floculer et que l'on pourrait composter avec des résidus de traitement de marcs. Appliqué aux vinasses de lies, ce traitement devrait permettre de faciliter la centrifugation des matières en suspension ; par contre, le volume des boues à traiter est augmenté.

On s'oriente actuellement vers d'autres traitements préliminaires comprenant le détartrage systématique de tous les effluents et l'élimination des levures des vinasses de lies par centrifugation sans ajouter de produits exogènes. Le détartrage permet de diminuer la charge polluante tout en récupérant un produit valorisable ; il augmente également le pH, ce qui ne fait que favoriser l'épuration biologique ultérieure (Mourgues, 1972).

Quant à l'élimination des levures des vinasses de lies, elles peut se faire à l'aide d'un séparateur à buses, comme l'ont montré les essais industriels effectués par l'un de nous (Maugenet, 1971). Cet appareil représente un des moyens pour éliminer, dans les vinasses de lies détartrées par les appareils Padovan ou Frilli, les matières

en suspension sous forme d'un lait de levures. Celui-ci pourra être ensuite séché et utilisé soit comme engrais, soit comme aliment du bétail.

Les effluents ainsi traités pourront être épurés biologiquement en adaptant une flore spécifique ; des essais de laboratoire l'ont montré et des essais industriels vont être prochainement effectués.

On utilisera ensuite des procédés physico-chimiques, si nécessaire, pour éliminer la couleur résiduelle. A ce sujet, la chaux donne de meilleurs résultats que le charbon actif sur des vinasses de vins rouges traitées biologiquement au laboratoire.

Reçu pour publication en octobre 1972.

SUMMARY

LABORATORY STUDY ON THE TREATMENT OF THE WINE DISTILLERIES WASTES BY ACTIVATED CARBON AND BY LIME

Physico-chemical treatments were carried out in order to test the possibilities of eliminating phenolic compouds from wastes before biological treatment.

Activated carbon allowed 95 p. 100 elimination of polyphenols from the wastes of red wines ; these compounds account for 25 p. 100 of the COD. The effectiveness of the treatment is low for the white wines wastes.

Lime, provided that the final pH reaches 11, eliminates an average of 80 p. 100 of phenolic compounds for the whole of different types of wastes, except those of white wines where its efficiency is lower ; the treatment also eliminates tartaric acid. The COD removal varies from 7 to 42 p. 100. The synthetic organic floculants improve the sludge sedimentation rate, but give an important volume of sludge (25 p. 100 of the waste used).

Because of this drawback, the authors move towards other pretreatment : recovery of tartrates from all the effluents and of yeasts in the lees, followed by biological treatment with an adapted population of micro-organisms.

RESUMEN

ESTUDIO DE LABORATORIO ACERCA DE LAS POSIBILIDADES DE DEPURACION DE LOS RESIDUOS DE LAS DESTILERIAS VINICOLAS POR MEDIO DEL CARBON ACTIVO Y DE LA CAL

Con objeto de determinar las posibilidades de eliminación de los compuestos fenólicos de los resíduos de destilerias vinicolas, antes de proceder a un tratamiento biológico, se ha procedido a ensayos de depuración físicoquímica.

El carbón activo permite eliminar el 95 p. 100 de los polifenoles de los resíduos de vinos tintos. Estos compuestos representan hasta un 25 p. 100 de la DCO. La eficacia del tratamiento es limitada cuando se trata de resíduos de vinos blancos.

Con la condición de alcanzar un pH 11, la cal permite eliminar el 80 p. 100 en promedio de los compuestos fenólicos sobre el conjunto de los distintos tipos de resíduos, excepto cuando se trata de resíduos de vinos blancos, en cuyo caso es más reducida. Este tratamiento elimina también el ácido tártrico. La DCO disminuye de 7 a 42 p. 100. Los floculantes orgánicos de síntesis permiten acelerar la velocidad de sedimentación de los lodos, pero su volumen es importante (25 p. 100 del volumen de resíduos utilizados).

Debido a este inconviennte, los autores se orientan hacia otros tratamientos preïiminares : recuperación de los tartratos en todos los efluentes, de las levaduras en los resíduos de heces, seguido de una depuración biológica por una flora adaptada.

RIASSUNTO

STUDIO IN LABORATORIO SULLE POSSIBILITÀ DI DEPURAZIONE DELLE VINACCE DELLE DISTILLERIE VINICOLE MEDIANTE IL CARBONE ATTIVO E LA CALCE

Sono state effettuate delle prove di depurazione fisico-chimica allo scopo di provare le possibilitá di eliminazione dei composti fenolici delle vinacce prima di un trattamento biologico.

Il carbone attivo permette di eliminare 95 p. 100 dei polifenoli delle vinacce dei vini rossi ; questi composti rappresentano fino a 25 p. 100 della DCO. L'efficacia del trattamento è debole sulle vinacce dei vini bianchi.

A condizione di arrivare a pH 11, la calce elimina 80 p. 100 in media dei compositi fenolici sull'insieme dei vari tipi di vinacce tranne per le vinacce di vini bianchi perle quali essa è più debole. Questo trattamento elimina egualmente l'acido tartarico.

La DCO diminuisce da 7 a 42 p. 100. I flocculanti organici di sintesi permettono di accelerare la velocità di sedimentazione dei fanghi ma il loro volume è elevato (25 p. 100 del volume di vinaccia utilizzata).

E' a causa di questo inconveniente che gli autori si orientano verso altri pretrattamenti : ricupero dei tartrati su tutti gli effluenti, dei lieviti nelle vinacce di fecce, per terminare con una depurazione biologica mediante flora adattata.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARDERE FRANCE OSSEN S. A., 1969. Procédé de traitement des effluents résiduaires issus des colonnes de distillation des distilleries de vin au moyen d'unités de traitements utilisant la mise en œuvre du procédé (invention TISSIER E.). Brevet 2 070 285 (B) (69 39 395). 17 novembre 1969.

FLANZY M., 1936. Les vinasses de distilleries vinicoles. *Rev. Vitic.*, **85**, 21-26 ; 37-44 ; 53-58.

JERIS J. S., 1967. A rapid COD test. *Water Wastes Engin.*, **4**, 89-91.

MAUGENET J., 1971. Travaux de recherches sur les nouvelles sources de protéines à partir des levures de vinification. *Rap. fin. Action conc. Technol. agric.*, contrat n° 67 106 DGRST, 1971-06.

MERCER W. A., 1970. Activated carbon reconstitution brine. *Nat. Symp. Food Proces. Wastes*, Portland.

MOURGUES J., 1972. La récupération de l'acide tartrique dans les distilleries vinicoles. In *Les Sous-Produits vinicoles et oléicoles*, F. A. O., Rome (à paraître).

MOURGUES J., MAUGENET J., 1969. Évaluation de la charge polluante des eaux résiduaires des distilleries vinicoles. *Ann. Technol. agric.*, 129-137.

MOURGUES J., MAUGENET J., 1972. Application de la technique acidimétrique de SCHNEYDER et PLUHAR au dosage rapide de l'acide tartrique total dans les sous-produits du vin. *Ann. Falsif. Exp. chim.*, 427-435.

NORME EXPÉRIMENTALE AFNOR T 90 103, novembre 1969. *Détermination de la demande biochimique en oxygène* (DBO).

PRO M. J., 1952. Report on spectrometric determination of tanin in wine and whiskies. *J. Ass. off. agric. Chem.*, **25**, 255-257.

SINGLETON V. L., ROSSI J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 144-158.

SODERQUIST M. R., 1971. Activated carbon renovation of spent cherry brine. *J. Water Pollut. Control. Feder.*, **43** (8), 1600-1608.

SOEIRA J. S., LINARES DE LIMA A., 1960. Traitement des effluents des installations industrielles de distillation des vins. *Trib. CEBEDEAU*, **48**, 149-152.

TOURLIÈRE S., 1954. Les distilleries françaises devant le problème des eaux résiduaires. *Alcools et Dérivés*, (34-35), 179-189.

WARCOLLIER G., TAVERNIER J., 1939. Les cidrases de distilleries de pommes. *Ann. Technol. agric.*, 33-51.

WOODWARD E., ETZEL J. E., 1965. Coacervation and chemical coagulation of lignin from pulp mill black liquor. *J. Water Pollut. Control. Feder*, (37), 990-1006.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (2), 211.

CHRONIQUE DES LIVRES

RIBÉREAU-GAYON (J.). — PROBLÈMES DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE. LES HOMMES ET LES GROUPES, Préface de J. FOURASTIE. — Paris, Dunod, 1972, 230 p.

Le développement de la recherche scientifique qui s'est produit ces dernières années a suscité de nombreux essais sur ce sujet. On considérait généralement l'aspect quantitatif des choses : la part de la recherche dans le revenu national, la répartition des moyens entre les diverses disciplines, le financement de la recherche. Voici que le Pr RIBÉREAU-GAYON aborde dans son livre les problèmes que pose la recherche au niveau de l'Homme. Il le fait en psychologue, en sociologue et en moraliste.

Le grand problème — et il n'est certes pas aisé à résoudre — est de concilier organisation et liberté. L'antinomie entre l'une et l'autre est au cœur de l'exercice et de l'expansion d'une recherche efficace. En réalité, dans la recherche scientifique, là où il faut choisir des tâches, il faut avant tout choisir les hommes auxquels on confiera ces tâches.

Cet ouvrage propose des solutions et apporte à la psychosociologie de la recherche scientifique des éléments d'étude, un ensemble d'observations et d'analyses qui, partant de la nature de la science et de la technologie, s'étend progressivement à l'homme, au groupe, à l'organisme, à l'organisation de la recherche, aux structures et à l'exercice des pouvoirs dans la recherche, finalement à la recherche dans les Universités, notamment dans le domaine de la technologie.

Au terme de cette analyse, la technologie apparaît comme un ensemble coordonné de connaissances techniques et non plus comme un catalogue de procédés. Elle constitue l'application, à un même objet, de moyens de recherches différents, et pour cette raison elle est authentiquement pluridisciplinaire dans ses bases scientifiques. Du fait de son objet, elle oblige à tourner les regards vers l'homme et vers la vie.

Cette technologie, longtemps tenue à l'écart d'une organisation scientifique, inspirée par la classification des sciences d'Auguste COMTE, trouve de plus en plus sa place dans l'Université, car c'est un carrefour où se situe la rencontre de la Science et de l'Homme.

Quarante-quatre ans d'expérience acquise dans la recherche technologique et l'enseignement ont permis au Pr RIBÉREAU-GAYON de nous proposer un véritable humanisme de la recherche, tout en reconnaissant que dans un domaine où tout est équilibre nuancé, le lecteur puisse opposer des conceptions différentes.

P. DUPUY

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé :* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Oenologie et de Technologie végétale, 11 - Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en Josas. On demande deux exemplaires.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à Mme Collon.

Technologie agricole.

annales de technologie agricole

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE DOCUMENTATION
11 JUIL. 1973
VERSAILLES

Compte-rendu des travaux du XIIIe symposium de la Commission Internationale des Industries Agricoles et Alimentaires

PARIS, Février 1972

"L'emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires"

1ère Partie

Trimestriel

1972

Vol. 21 . N°3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Compte rendu des travaux du 13e symposium de la Commission internationale des Industries agricoles et alimentaires

Paris, 14-16 février 1972

« L'emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires »

INTRODUCTION

L'utilisation des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires s'est largement développée au cours du dernier quart de siècle et il est apparu au Comité directeur de la Commission internationale des Industries agricoles et alimentaires qu'il était opportun de faire le point sur cette importante question. Aussi devons-nous remercier les biochimistes et les technologues qui ont répondu à notre appel, confirmant l'intérêt et l'actualité du thème choisi.

L'Histoire des enzymes est liée à l'une des plus anciennes industries agricoles, la bière ; le malt de l'orge est à l'origine de la découverte au début du XIXe siècle de la diastase par PAYEN et PERSOZ qui en reconnurent la thermolabilité et l'activité catalytique. Une partie d'enzyme permettant de solubiliser 2 000 fois son poids de fécule et d'opérer sa conversion en dextrine et en sucre. Ils furent ainsi les premiers à ébranler la théorie de Pasteur pour qui la fermentation n'était possible qu'en présence d'un organisme vivant.

La levure qui était jusqu'à ces dernières années le catalyseur du brassage de la bière, cède maintenant la place à une préparation enzymatique, la fromagerie remplace la caillette de veau par des préparations de présure d'origine bactérienne ; l'emploi des sels attendrisseurs constitués par un mélange de chlorure de sodium et de papaïne, constitue un des nouveaux aspects de l'emploi des enzymes dans les industries alimentaires. L'action des enzymes sur les protéines animales pouvant être poussée jusqu'à la solubilisation complète en vue de l'obtention de concentrés protéiques alimentaires.

L'industrie des fruits et légumes qui primitivement se limitait à l'emploi des enzymes pectolytiques, en vue d'augmenter le rendement dans la préparation de jus de fruits, s'oriente maintenant vers l'utilisation d'enzymes susceptibles de développer les qualités organoleptiques et aromatiques des produits manufacturés. L'œnologie elle-même, qui est de toutes les industries agricoles la plus ancienne et la plus traditionnaliste, n'échappe pas au progrès et les enzymes fixées sur un support solide

permettent maintenant d'orienter la fermentation, sans que la notion de vin naturel, à laquelle sont attachés les viticulteurs et le législateur, soit compromise.

Il nous faut, en terminant cette brève introduction, souhaiter que les travaux de ce symposium contribuent à développer et améliorer l'emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires.

L. de Saint Rat

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 219-220.

ALLOCUTION INAUGURALE

Professeur Dr R. AMMON

Président de la Commission internationale des Industries agricoles et alimentaires

Physiologisch-Chemisches Institut, Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

C'est pour moi à la fois une joie et un très grand honneur de présider à l'ouverture d'un Symposium de la Commission internationale à Paris. Le choix de Paris pour la tenue de cette réunion m'apparaît comme particulièrement heureux, Paris est à la fois un centre scientifique reconnu du monde entier et une capitale de la gastronomie.

J'ajouterai à ces raisons, celles qui me concernent personnellement. Depuis plus de vingt ans, j'appartiens au corps enseignant de l'Université sarroise. L'Université de Saarbrücken est de toutes les universités allemandes, celle qui entretient les plus étroites relations avec la France à qui elle doit en partie son existence.

C'est avec l'aide de la France, que fut fondée en 1947, l'université de la Sarre, il s'agissait à l'origine d'un Institut d'Études supérieures administrativement rattaché à l'Université de Nancy. Cette institution qui fonctionne en territoire sarrois depuis 25 ans a fortement contribué à développer et à renforcer les relations amicales qui se sont établies entre la France et l'ancien territoire sarrois.

J'ajouterai qu'aujourd'hui après le retour de la Sarre à la République fédérale d'Allemagne, ces relations sont restées très vivantes et se sont encore fortifiées, elles se sont, sur le plan universitaire, concrétisées par un jumelage entre l'université de Nancy et celle de Saarbrücken.

Mesdames et Messieurs

Bien longtemps avant que l'homme sache ce que représente un ferment il en faisait déjà usage pour améliorer son alimentation. Je citerai à ce propos la fermentation. Tous les peuples de la terre ont depuis les temps les plus reculés utilisé la fermentation des glucides pour produire des boissons alcooliques.

Ce procédé de fermentation a incité les chercheurs à connaître les mécanismes de cette réaction.

En France, c'est Louis PASTEUR qui en 1857 démontra que la fermentation était liée à l'activité vitale de la cellule de levure, « *Fermentatio* », c'est ainsi qu'on désignait le développement gazeux qui caractérisait ce phénomène. De là est né le

terme ferment qui en grec se traduit par « *zymein* », d'où dérive le mot enzyme. L'Enzymatique a permis d'expliquer des phénomènes connus depuis des millénaires. Homère parlait déjà du caillage du lait par le jus de figue. L'utilisation des feuilles de *carica papaya* ou de leur suc pour raccourcir le temps de cuisson des viandes est pratiqué depuis des centaines d'années par les habitants de l'Amérique centrale, bien avant qu'on ait reconnu la nature de la papaïne et son action sur les protides. On pourrait encore citer de nombreux exemples montrant les relations étroites qui lient l'Enzymologie et la Science de la Nutrition, relations qui ont pris au cours des dernières décennies une importance considérable.

Vers la fin du siècle on a notamment reconnu la nature chimique des ferments et leur spécificité et démontré leur mécanisme d'action. L'étude systématique des enzymes a permis d'en développer les applications pour le traitement des aliments. Ce sont ces problèmes qui constituent le programme de ce symposium.

Bien que limité pour satisfaire aux exigences du temps, le programme du 13e symposium présente un grand intérêt pour les biochimistes et les nutritionistes voire même pour les économistes. C'est pour moi un agréable devoir d'exprimer mes remerciements aux conférenciers qui ont accepté d'abandonner leur laboratoire et leur enseignement pour venir nous faire bénéficier de leur savoir et nous présenter leurs réflexions. Je remercie également tous ceux qui ont accepté d'abandonner leurs occupations quotidiennes pour participer à cette réunion. Je souhaite que leur désir ne soit pas déçu et qu'ils trouvent au cours de leur séjour dans la capitale la satisfaction de leurs aspirations scientifiques, artistiques et — pourquoi pas aussi gastronomiques.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 221-235

ÉVOLUTION ET PERSPECTIVES NOUVELLES DE L'EMPLOI DES ENZYMES DANS LES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES

Professeur J.-É. COURTOIS

Professeur de Biochimie à l'Université René Descartes de Paris,
Membre de l'Académie nationale de Médecine,
Président de l'Académie de Pharmacie (1972),
Président de la Société de Chimie biologique (1972)

Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, Paris 6e

RÉSUMÉ

Historique conduisant de l'emploi empirique des enzymes à leur utilisation rationnelle.

Une voie nouvelle très prometteuse est l'utilisation d'enzymes liées à un support insoluble, le polymère supportant l'enzyme peut être aisément retiré du milieu et réutilisé à nouveau.

Deux propriétés fondamentales des enzymes sont à la base de l'extension de leurs usages : *a*) la spécificité d'action, *b*) l'aptitude à réagir à une température modérée qui n'altère pas les autres constituants de l'aliment.

Les dépolymérases demeurent les préparations ayant la plus large variété d'emplois : amylases, cellulases, hémicellulases, pectinases, protéases en particulier. Beaucoup de préparations contiennent d'ailleurs plusieurs enzymes associées du même groupe.

Il vient s'y ajouter maintenant diverses enzymes purifiées à emploi plus délimité : α-galactosidase, glucose-oxydase, etc.. La tendance ira vraisemblablement vers l'usage de préparations relativement purifiées.

La fabrication des enzymes en quantités massives a posé divers problèmes d'hygiène du travail.

Dans plusieurs pays les services officiels, codifiant la législation des matières alimentaires, mettent au point les critères exigibles pour autoriser l'emploi d'une préparation enzymatique dans la confection des aliments et boissons.

LES PRINCIPALES ÉTAPES DE L'ÉVOLUTION DE L'EMPLOI DES ENZYMES

La période empirique

L'on situe habituellement au début du Néolithique les débuts de l'agriculture. Dès lors, se développa, aussi bien dans l'Ancien-Monde que dans le Nouveau, une civilisation à prédominance agricole.

L'Homme s'efforça tout d'abord de sélectionner et d'améliorer les plantes riches en amidon. Ce furent principalement et presque exclusivement les céréales dans le Proche-Orient et en Europe ; l'Extrême-Orient cultiva le Riz, le Pérou le Haricot, le Mexique et les régions Andines le Maïs.

Cette forme de civilisation, que l'on pourrait dénommer « agricole glucidique » prédomina jusqu'au début de ce siècle. Beaucoup de guerres eurent pour but de s'assurer les régions fertiles propres à la culture. Le meilleur exemple en est fourni par Rome dont l'expansion belliqueuse eut comme principal objectif de s'assurer les terres à blé.

L'Homme s'aperçut assez vite de façon empirique que certaines opérations amélioraient la qualité des aliments ou permettaient d'obtenir de nouvelles formes alimentaires comme les breuvages. C'est une notion toute nouvelle dans l'histoire des sciences que les ferments interviennent par leurs enzymes. Il fallut en effet attendre la fin du siècle dernier pour que PASTEUR précise le rôle des levures dans la fermentation alcoolique, puis que BÜCHNER sépare de la levure ce mélange d'enzymes dénommé zymase apte à réaliser la fermentation alcoolique.

Mais l'ingéniosité de l'espèce humaine avait su appliquer depuis des millénaires cette fermentation pour l'obtention de boissons alcoolisées plus ou moins savoureuses. Le jus de raisin, le miel, divers fruits contenaient des glucides directement fermentescibles. Par contre, la plupart des ferments alcooliques étaient dépourvus d'amylases, ils ne pouvaient donc agir sur les produits amylacés. Il y avait là un grave inconvénient, car l'agriculture naissante commençait à fournir des graines amylacées.

Il était donc nécessaire de réussir à transformer l'amidon en maltose, les levures hydrolysant le maltose en glucose, puis le dégradant ensuite en alcool éthylique. Ceci fut réalisé empiriquement par deux types de procédés qui me paraissent représenter la première utilisation des enzymes pour la confection d'aliments. Le premier consista à utiliser l'accroissement de l'activité amylasique qui se manifeste lors de la germination de graines variées, l'orge en particulier.

Le second, nettement moins hygiénique, consista à incorporer par mastication l'amylase salivaire à la farine de graine amylacée ; la pâte obtenue étant alors récupérée puis soumise à la fermentation. Ce procédé est encore utilisé par des populations andines. Pendant très longtemps, fermentation et action enzymatique délimitée demeurèrent confuses. Toutefois le levain devait devenir l'exemple de ce que pouvait réaliser une petite quantité d'une substance pouvant transformer des proportions bien supérieures de la matière à laquelle ce levain était incorporé. Cette disproportion entre les concentrations de l'enzyme et du substrat transformé est la caractéristique dominante des réactions catalytiques.

L'existence des enzymes est pressentie puis confirmée

ARISTOTE, l'une des intelligences les plus vastes qui aient existé, avait pressenti, trois siècles avant notre ère, l'existence des catalyseurs biologiques. Le professeur Oreste STEPHANOPOULOS de Thessalonique s'est livré à une analyse des œuvres de son compatriote (1). ARISTOTE admet que certaines puissances spéciales existent auprès des plantes, des animaux et dans chacune de leurs parties. Il qualifia ainsi par le terme « pepsis » la digestion des aliments ; en outre il classa parmi les digestions la vinification du moût et la tourne du vin parce que ces actions ne sont que deux

phénomènes biocatalytiques. « La digestion est un perfectionnement, c'est une genèse simple et naturelle, une transformation faite par ces actions. »

Il fallut ensuite attendre la fin du XVIIe siècle pour que STAHL cherche à analyser l'action de l'enzyme de la salive.

C'est l'une des plus importantes industries de fermentation, celle de la bière, qui devait susciter les recherches ayant permis d'obtenir la première préparation enzymatique. En 1833, Anselme PAYEN et Jean-François PERSOZ, décrivent la diastase de l'orge germée. Comme l'a si bien démontré Paul FLEURY (2), ils mettent en évidence les caractéristiques fondamentales des enzymes : action catalytique, thermolabilité, solubilité dans l'eau et insolubilité dans l'alcool. Dès lors, le nombre et la variété des enzymes décrites ne fit que s'accroître (2). Vers 1860, l'amylase de l'orge germée et la pepsine furent introduites en thérapeutique comme agents supplétifs pour lutter contre les insuffisances digestives. Les emplois dans l'industrie furent plus tardifs (3). Cependant, la présure extraite du *fundus* des estomacs de Veau connut vite une grande vogue dans les campagnes françaises pour aider à fabriquer les fromages domestiques.

Il faut citer aussi la papaïne ; mais là il s'agit plutôt d'une vulgarisation de son emploi pour attendrir les viandes. Les populations des pays tropicaux utilisaient depuis longtemps le fruit de l'arbre à melons, le *Carica papaya* pour améliorer les viandes assez fibreuses de leurs bovidés.

Le pancréas, avec ses enzymes susceptibles d'hydrolyser les trois principaux groupes de constituants biologiques, fut également employé. Mais ces enzymes d'origine végétale ou animale n'offraient que relativement peu de possibilités.

La production industrielle des enzymes

C'est à la fin du siècle dernier que débute la fabrication industrielle des enzymes sur une échelle étendue. En 1894, TAKAMINE réalisa au Japon la culture massive des *Aspergillus*. Peu après, BOIDIN et EFFRONT, en France, préparèrent à l'échelle industrielle les amylases bactériennes (B. *subtilis* et *mesentericus*).

La production massive d'enzymes de microorganismes est une conséquence indirecte à partir de 1945 de l'obtention des antibiotiques à partir de cultures de microorganismes.

Les antibiotiques ont révolutionné la thérapeutique, leur production à une grande échelle industrielle exigea la mise au point de tout un appareillage de fermenteurs à vaste capacité. De même la sélection des souches et leur conservation purent être réalisées de façon précise dans l'industrie. Des progrès considérables furent en outre réalisés pour choisir les composants du milieu de culture, contrôler son pH et au besoin, le faire ajuster automatiquement afin d'en assurer la fixité, thermostater le fermenteur et enfin fixer la durée d'incubation permettant d'obtenir le rendement optimum de la biosynthèse du composé à produire.

Il était tentant de recourir à ces procédés bien mis au point pour cultiver des microorganismes producteurs d'enzymes (HOLME *et al.* (4)).

D'ailleurs certaines enzymes furent décelées lors des recherches sur les antibiotiques. L'exemple le plus typique est fourni par le *Penicillium notatum* que l'on crut, un court laps de temps être producteur d'un second antibiotique associé à la pénicilline. L'action bactéricide n'était que celle bien connue du peroxyde d'hydro-

gène, ce dernier était produit par la glucose-oxydase lorsqu'elle oxyde le glucose en acide gluconique. La glucose-oxydase est devenue un réactif très spécifique pour la recherche et le dosage du glucose, elle commence d'être employée, comme nous le verrons par la suite, dans les industries alimentaires.

C'est donc parallèlement à la production des antibiotiques par fermentation que l'on a vu se développer la production massive d'enzymes. Dans des conditions d'oxygénation appropriées, les cultures en milieu liquide donnent en général une meilleure production d'enzymes que les cultures sur un milieu solide. C'est cependant l'inverse pour la plupart des protéases.

Cette production industrielle croissante des enzymes se trouvait d'autant plus justifiée que les emplois des enzymes les plus variées devenaient plus nombreux.

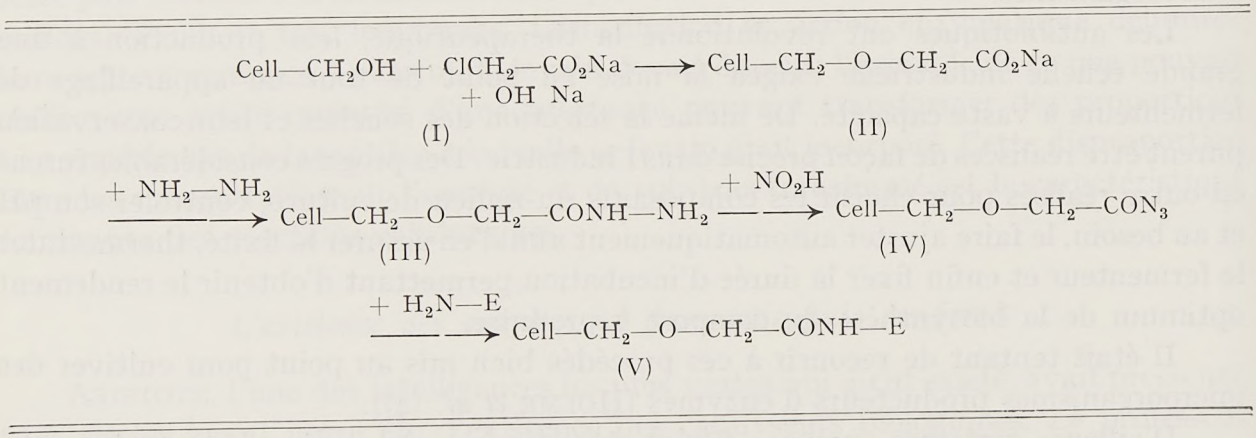
Mais ces enzymes étaient le plus souvent assez impures ; la séparation d'enzymes hautement purifiées nécessite de multiples manipulations, ce qui augmente le prix de revient.

Pour la plupart des usages des enzymes, il n'est pas nécessaire de disposer de préparations considérablement purifiées. Il est d'ailleurs parfois intéressant d'avoir plusieurs enzymes associées, c'est le cas pour les cellulases, hémicellulases et pectinases que nous aurons l'occasion d'évoquer de façon plus détaillée dans la suite de cet exposé.

LES ENZYMES LIÉES A UN SUPPORT INSOLUBLE

L'adjonction d'une préparation enzymatique peu active pour la confection d'un aliment est à déconseiller. En effet, l'on utilise une faible proportion pondérale d'une enzyme dispersée dans une quantité importante de substances associées ; ces dernières peuvent modifier le goût de l'aliment ou s'insolubiliser. Nous venons d'indiquer que les enzymes purifiées sont onéreuses. Il y avait donc un dilemme qui va sans doute trouver une solution dans l'introduction sur le marché d'enzymes fixées sur un support insoluble (5) (6).

TABLEAU I



L'enzyme est généralement liée par certains de ses groupes aminés à un polymère. Les dérivés substitués de la cellulose sont les supports les plus employés.

Voici à titre d'exemple comment l'on peut greffer une protéine par son groupe

aminé. Les groupements alcool primaire en position 6 des unités de β-anhydroglucose reliées en 1 → 4 dans la cellulose sont les plus réactionnels (tabl. 1). Soit

$$\text{Cell} - CH_2OH \quad (I)$$

la représentation schématique de la cellulose mettant en évidence la fonction alcool primaire d'une unité d'anhydroglucose. L'acide monochloracétique peut s'y fixer en milieu alcalin pour former une carboxy-méthylcellulose (II) qui est transformée en son hydrazide (III). L'on applique alors la réaction de Curtius des azides, l'acide nitreux conduit à l'azide (IV) qui est insoluble. (IV) est suspendu dans la solution d'enzyme purifiée représentée schématiquement par $E - NH_2$, afin de mettre en évidence son groupe aminé. Après contact en milieu de pH faiblement alcalin et à 0° l'on acidifie à pH 4,0 par l'acide phosphorique. Le polymère carboxyméthylcellulose enzyme (V) est séparé par filtration, lavé pour éliminer l'excès de solution protéique. Il peut être conservé soit en suspension, soit après dessiccation dans le vide à basse température.

Il existe de nombreux procédés brevetés de préparation des enzymes liées à des matrices artificielles (6). Les supports sont : des dérivés de la cellulose, carboxyméthylcellulose et diéthylaminoéthylcellulose, d'autres polysaccharides modifiés comme l'agarose, les dextranes, des gels de polyacrylamide, des copolymères d'anhydride maléique et d'oxyde d'éthylène, etc. La fixation à des groupes basiques de la protéine enzymatique est réalisée soit par la réaction des azides de Curtius, exemple que nous venons de schématiser, soit en faisant intervenir des dérivés de triazines ou des sels de diazonium. A l'heure actuelle, de nombreuses firmes ont commercialisé un éventail étendu et varié d'enzymes insolubilisées.

Elles peuvent être employées en les suspendant dans un milieu liquide d'où elles sont ensuite récupérées par filtration ou centrifugation. La préparation à traiter peut aussi être filtrée à travers une colonne du copolymère enzymatique.

Dans ce dernier cas, lorsque le substrat de l'enzyme est de faible poids moléculaire, l'on inclut l'enzyme insolubilisée dans un granule possédant à l'extérieur un gel de cohésion définie. Ceci permet d'adjoindre les avantages de la chromatographie d'exclusion à l'intervention de l'enzyme à l'intérieur des granules du gel, les produits de la réaction pouvant alors diffuser à l'extérieur du gel.

Les principaux avantages des enzymes insolubilisées sont : *a*) une plus grande stabilité de l'enzyme qui possède une résistance supérieure à la dénaturation, *b*) une moindre susceptibilité à la dégradation résultant d'une digestion par des protéases et surtout, *c*) la possibilité de récupérer l'enzyme insolubilisée, pour la réutiliser lors d'une nouvelle opération. Les enzymes insolubilisées sont évidemment d'un prix de revient plus élevé que les préparations enzymatiques non purifiées. La possibilité de les réutiliser compense cet inconvénient. Il appartient aux industriels de calculer sur le plan économique, le contrebalancement de cet inconvénient et de cet avantage.

Pour le moment, il est indiscutable que les enzymes insolubilisées représentent une méthode de choix pour éliminer une substance transformable par une enzyme et présente en faibles proportions dans le milieu. Par exemple, élimination de faibles quantités de glucose d'une solution en utilisant la glucose-oxydase.

L'avenir sera-t-il aux enzymes synthétiques ?

L'histoire de la Biochimie montre que lorsque l'on arrive à maîtriser et domestiquer un composé, la synthèse de ce corps est proche, celle de ses analogues suit de près.

La synthèse polypeptidique a pris une extension considérable au cours des dernières années. La méthode de Merryfield en particulier offre des possibilités qu'il n'est pas exagéré de considérer comme extrêmement étendues, écrire illimitées serait encore assez téméraire.

De nombreuses hormones polypeptidiques préparées par synthèse sont maintenant utilisées en thérapeutique.

Des corps possédant une longue séquence peptidique ont été synthétisés au laboratoire, les premières réussites spectaculaires ont été l'obtention de l'insuline parmi les hormones et de la ribonucléase parmi les enzymes.

Sur le plan théorique, il est indiscutable que dans un proche avenir d'autres enzymes seront reproduites par synthèse ; il sera également préparé des corps contenant les centres actifs d'une enzyme et qui ne seront pas présents dans la nature.

Les enzymes synthétiques seront-elles utilisées dans l'industrie ? Oui, mais quand ? Il est très difficile d'anticiper car pour le moment ce sont des synthèses très complexes et le rendement final est en général assez faible car il faut réduire au minimum les réactions secondaires.

Schématisons à l'excès pour expliciter ces réactions secondaires, si l'on veut lier une chaîne polypeptidique A à une autre chaîne polypeptidique B, on obtient A — B, mais aussi les dimères A — A et B — B. C'est l'un des principaux obstacles qu'il faut surmonter pour obtenir des hormones polypeptidiques de faible poids moléculaire. Les difficultés seront encore accrues lorsque l'on atteindra les très longues chaînes polypeptidiques.

L'ingéniosité des chimistes arrivera progressivement à réduire ces difficultés, améliorer les rendements, et de ce fait, abaisser les prix de revient.

Dès lors, l'emploi d'enzymes synthétiques dans l'industrie sera économiquement rentable. Il serait particulièrement présomptueux de proposer une date, même très approximative ; il nous paraît préférable de ne pas chercher à prophétiser mais de revenir aux applications actuelles des enzymes et d'en examiner l'intérêt et les avantages de leur emploi.

AVANTAGES DE L'EMPLOI DES ENZYMES

Les plus dominants sont la spécificité d'action et l'aptitude à réagir à une température modérée.

A. — *Spécificité d'action*

La spécificité d'action des enzymes est l'un de leurs principaux avantages sur les réactifs chimiques. Une hydrolyse par un acide dilué va rompre indifféremment les liaisons osidiques et peptidiques. Il faut des osidases et peptidases distinctes pour

les hydrolyser par voie enzymatique. Dans un même groupe la spécificité est encore plus nuancée. L'on connaît depuis Emil FISCHER que les osidases ne peuvent cliver que les osides ayant une certaine conformation. C'est ainsi que les α-D-glucosides sont hydrolysés par des α-glucosidases inactives sur les β-D-glucosides. De même, les β-glucosidases demeurent sans effet sur les liaisons osidiques des α-D-glucosides. Il existe une grande variété d'enzymes susceptibles d'hydrolyser avec une spécificité très limitée, moyenne, ou étendue des liaisons α-glucosidiques.

Elles font partie des oligosaccharidases ou des polysaccharidases avec quelques enzymes intermédiaires assurant la transition. Nous n'en noterons que quelques exemples intéressant l'alimentation. Les disaccharides préexistant dans les aliments ou provenant de la digestion partielle par l'amylase, doivent être clivés lors de la digestion ; ceci afin que leurs constituants soient absorbés et métabolisés.

Les cellules en brosse de la muqueuse de l'intestin grêle renferment plusieurs α-glucosidases qui ont été individualisées à la suite des recherches de DAHLQVIST, SEMENZA et différents autres auteurs (7) (8) (9).

C'est ainsi que l'on a réussi à différencier :

a) une isomaltase hydrolysant le maltose α-glucosido-1-4-glucose et son isomère 1-6 l'isomaltose,

b) une sucrase attaquant le saccharose au niveau de sa liaison α-glucosidique ; cette enzyme hydrolyse en outre le maltose,

c) des maltases relativement thermostables,

d) une tréhalase qui paraît limiter son action à un seul substrat naturel le tréhalose, ce disaccharide est formé par la liaison de deux molécules de glucose unies par leur groupe réducteur.

Ces enzymes coexistent avec une β-galactosidase nécessaire pour utiliser le lactose en le clivant en galactose et glucose.

Il existe des déficiences congénitales en certaines de ces enzymes ; il s'agit d'un problème de toute actualité, objet de multiples travaux dans les pays les plus variés. Ce sont des erreurs innées du métabolisme avec absence du gène contrôlant la synthèse de l'enzyme correspondante. Jusqu'ici, ce sont les intolérances héréditaires au saccharose et surtout au lactose qui ont été le mieux explorées.

Il est réalisable de tourner la dépression métabolique en administrant un régime ne contenant pas de saccharose dans le cas du déficit en sucrase ; ou privé de lactose dans le déficit en la β-galactosidase agissant sur ce disaccharide, dénommée habituellement lactase.

L'emploi de sucrase permettra de débarrasser les aliments du saccharose. Parallèlement, une lactase réalisera une opération similaire pour le lactose. L'on commence à utiliser ces deux enzymes pour conditionner des préparations diététiques.

Une autre solution est l'adjonction à des aliments classiques des enzymes que ne peut élaborer le sujet atteint du déficit correspondant. Mais en plus des déficits congénitaux peuvent se manifester des intolérances aux disaccharides chez les adultes. Il y a diminution du taux de l'enzyme, et parfois même, dans certaines affections intestinales, suppression de la biosynthèse de la disaccharidase.

Des statistiques portant sur les intolérances plus ou moins aiguës vis-à-vis du lactose viennent d'être établies dans différents pays. Les résultats réunis par DAHLQVIST (10) dans une récente revue sont assez impressionnants. Le pourcentage

d'adultes déficients en lactase intestinale est de 17 à 20 en Grande-Bretagne et en Suisse, il atteindrait 67 chez les Indiens d'Amérique du Nord, 72 chez les Esquimaux du Groënland et 88 dans la population d'origine grecque de l'île de Chypre.

Il est indiscutable que les industries des produits laitiers seront amenées à prendre en considération ce problème et vraisemblablement demander leur aide aux préparations enzymatiques.

Applications de la spécificité.

Selon le problème industriel à résoudre, il sera nécessaire d'avoir recours soit à une enzyme purifiée et d'action délimitée, soit à un mélange d'enzymes s'associant pour obtenir le résultat escompté.

Il serait fastidieux de vous dresser la longue liste d'enzymes utilisées dans l'industrie ; nous ne choisirons que des exemples extrêmes entre lesquels viennent s'insérer les multiples enzymes employées.

1. *Cas où une seule enzyme est exigée.*

Ce sera celui de l'α-galactosidase dans l'industrie sucrière. Les mélasses renferment associés du saccharose avec une faible proportion d'un trisaccharide le raffinose, α-galactoside en 6 de la fraction gluco-pyranosyl du saccharose. Dans l'industrie sucrière il est bien connu que le raffinose est un obstacle à la cristallisation du saccharose ; les mélasses ayant laissé cristalliser du saccharose s'enrichissent en raffinose, dès que la proportion de raffinose atteint 6 à 10 p. 100 le saccharose ne cristallise plus. Suzuki et coll. (11) ont préparé une α-galactosidase à partir des cultures d'une moisissure du sol *Mortierella vinacea*. L'enzyme scinde le raffinose en galactose et saccharose. Les conditions de culture de la moisissure ont été établies pour limiter à un minimum la production d'une invertase (fructofuranosidase) hydrolysant le raffinose en fructose et mélibiose et le saccharose en fructose et glucose.

2. *Cas où l'action de la première enzyme doit être complétée par une seconde enzyme.*

La glucose-oxydase oxyde la fonction aldéhydique du glucose en l'acide aldonique correspondant, l'acide gluconique.

$$R—CHO + O_2 + H_2O \rightarrow R\ CO_2H + H_2O_2 \qquad (1)$$

Le peroxyde d'hydrogène formé est le plus souvent un oxydant gênant, il est décomposé par une enzyme la catalase selon le schéma.

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2\ O_2 \qquad (2)$$

Le bilan de la séquence des deux réactions est la fixation de la moitié de l'oxygène sur le glucose, les deux enzymes pouvant continuer de réagir à nouveau.

Le couple glucose-oxydase-catalase connaît de multiples applications :

a) en présence de glucose, élimination de l'oxygène nuisant à la conservation : boîtes de conserves, tubes de mayonnaise,

b) en présence d'oxygène, élimination du glucose. C'est ainsi que dans les œufs en poudre le glucose réagissant avec les groupes aminés des protéines conduit à des combinaisons de teinte brune ; le couple des deux enzymes prévient ce brunissement.

3. *Cas où plusieurs enzymes agissent complémentairement.*

L'exemple le plus caractéristique est probablement celui des préparations commerciales de cellulases et hémicellulases. Selon leur origine et leur degré de purification, elles renferment en proportions variées plusieurs des enzymes suivantes :

a) *Cellulases proprement dites.*

Il en existe plusieurs types dont la classification est encore discutée. L'on distingue :

1° les cellulases C_1 réagissant sur les chaînes compactes de cellulose, elles les dépolymérisent en cello-dextrines ;

2° les cellulases C_x agissent sur les cello-dextrines et les dérivés substitués de la cellulose dispersables dans l'eau comme les carboxyméthylcelluloses et hydroxyéthylcelluloses ;

3° diverses β-glucanases agissant sur les polymères du β-glucose.

L'action des cellulases conduit à un disaccharide le cellobiose. Il est hydrolysable en deux molécules de glucose par certaines β-glucosidases. Une partie des β-galactosidases comme celles des amandes, de l'intestin grêle ont une spécificité assez étendue leur permettant d'hydrolyser les β-glucosides et β-galactosides.

b) *Hémicellusases.*

Enzymes encore assez mal connues susceptibles de scinder certaines des liaisons osidiques variées présentes dans le groupe étendu des hémicelluloses. Parmi les principales hémicellulases figurent les β-D-mannanases, β-D-xylanases, α-L-arabanases, α-D-galactosidases.

c) *Pectinases.*

Dans les tissus végétaux, le bois y compris, les pectines occupent principalement les espaces intercellulaires. La dépolymérisation par les pectinases permet donc la dissociation des cellules et en outre une forte diminution de la viscosité des pectines.

Les fibres de celluloses, hémicelluloses sont le plus souvent enchevêtrées dans les parois cellulaires ; elles sont en outre souvent englobées et parfois empaquetées dans un gel formé par diverses hémicelluloses et, en outre, les galactoxyloglucanes (amyloïdes), les galactomannanes, les pectines, etc.

L'intervention d'une des enzymes associées dépolymérise plus ou moins complètement certains des polysaccharides, elle favorise de ce fait l'accessibilité des autres polysaccharidases aux liaisons des chaînes de polysaccharides différents. En général, l'on ne demande pas aux préparations commerciales de cellulases et hémicellulases d'assurer le clivage de la quasi-totalité des liaisons osidiques. L'on préfère leur demander un début de dépolymérisation d'où résultent : une dislocation des parois cellulaires, la dispersion dans l'eau des constituants solubles emprisonnés dans les parois, la formation de polysaccharides moins condensés dispersables dans l'eau. La conséquence la plus fréquente est en outre une augmentation de la fluidité du milieu. Comme la plupart, sinon la presque totalité, de ces préparations commerciales renfermant des amylases, l'amylolyse vient compléter de façon similaire les réactions de dépolymérisation indiquées. Dans deux précédents mémoires (12) (13), nous avons développé plus en détail l'intervention de ces enzymes associées. Les préparations commerciales sont pour la plupart d'origine fongique ; mais de telles

associations enzymatiques peuvent exister chez certains animaux. Avec C. Chararas nous les avons décelées régulièrement dans tous les insectes xylophages que nous avons étudiés (14) ; ces enzymes élaborées par l'insecte l'aidant à creuser ses galeries dans le bois.

Dans le tableau 2, nous avons groupé quelques-uns des emplois des préparations de cellulases et hémicellulases. Selon le but poursuivi l'on aura recours à des préparations où prédomineront certaines de ces polysaccharidases. C'est ainsi que les plus riches en pectinases seront préférées dans la confection des jus de fruits, dans ce cas on ne négligera point pour cela l'intervention adjuvante des amylases disloquant les amyloplastes en suspension.

TABLEAU 2

Principaux emplois des préparations commerciales de cellulases et hémicellulases associées

1. — *Digestion des aliments végétaux*

a) *Homme.*

Thérapeutique consistant à les administrer sous des formes pharmaceutiques (comprimés, granules, gélules, etc.) lors des repas. Permettent la désagrégation des parois cellulaires des végétaux coriaces, des crudités, rendant ainsi accessibles à d'autres enzymes les constituants à l'intérieur des cellules : amidon et protéines entre autres. Action favorable contre les digestions difficiles, le météorisme, les pesanteurs abdominales.

b) *Animaux d'élevage.*

Même principe — permettent d'accroître le gain de poids de volailles et animaux de boucherie ; adjoints en poudre à des aliments tels que maïs, soja, son, etc.

2. — *Dépolymérisation des parois des levures, chlorelles*

Ceci favorise l'accessibilité des constituants intracellulaires : protéines, glucides, vitamines, etc. Utilisés pour la confection d'aliments pour animaux.

3. — *Fabrication d'extraits fluides*

A partir de végétaux : extraits de Café, Cacao, etc.

4. — *Brasserie*

Solubilisation plus accentuée des polysaccharides de l'Orge.

5. — *Maturation de la choucroute*

6. — *Extraction des essences végétales*

7. — *Traitement des algues pour en extraire les polysaccharides*

Agars-agars, géloses diverses.

8. — *Lyse partielle de fibres cellulosiques*

Un traitement de courte durée par les cellulases modifie la surface des fibres, applications dans les industries textiles et papetières.

9. — *Digestion de résidus polluants : papiers usés*

Cartonnages, feuilles mortes digérés soit en surface, soit dans des fosses septiques.

B. — *Intervention à température modérée*

Ce second avantage était pressenti depuis longtemps et mis en pratique dans les industries de fermentation. L'on savait empiriquement que ces opérations étaient plus rapides au voisinage de 40° qu'à 20°.

Il est plus difficile de maîtriser un ferment qu'une enzyme, des fermentations accessoires pouvant se manifester. D'autre part, le microorganisme ne produit d'enzymes que dans le but égoïste de croître et se multiplier. Il utilise pour son métabolisme une partie du substrat, en dissipe une fraction par sa thermogenèse.

L'enzyme est plus facile à domestiquer et l'on peut opérer selon les cas à des températures étagées de 5° à 70°, voire même plus pour quelques enzymes. L'enzyme permet donc une plus grande souplesse d'utilisation que le ferment dont le développement est optimum dans un intervalle restreint de température.

L'on se trouve à même de sélectionner la température de la réaction enzymatique pour obtenir l'effet désiré sans altérer d'autres constituants biologiques présents dans l'aliment. En outre, l'enzyme sera utilisable pour obtenir des corps fragiles.

La glucoamylase nous en fournit un exemple. Cette amylase a comme principale source des cultures de souches sélectionnées de *Rhizopus* ou d'*Aspergillus* ; l'enzyme attaque les extrémités non réductrices des chaînes de l'amidon et en détache les unités glucose. La glucoamylase est utilisée pour obtenir du sirop de glucose et même du glucose cristallisé de teinte blanche et de bel aspect. MARSHALL et WHELAN (15) ont décrit un procédé où le glucose libéré est séparé par ultrafiltration.

Un dernier point mérite d'être signalé au sujet des avantages des enzymes. Ce sont devenus des réactifs précieux en analyse. L'on trouve dans le commerce des enzymes purifiées utilisables pour des analyses de Chimie clinique où elles ont pris une grande extension. Les enzymes commencent aussi à être utilisées pour l'analyse bromatologique si indispensable pour le contrôle de la qualité des aliments.

Nous n'en présenterons qu'un exemple se rapportant à l'une des déterminations les plus anciennes et les plus fréquentes : un mélange de glucose et saccharose. Ce problème était résolu jusqu'ici par des analyses indirectes portant sur le mélange avant et après hydrolyse acide ; la polarimétrie ou le dosage chimique des sucres réducteurs exigeaient un prélèvement assez important. Les enzymes offrent une élégante solution avec un prélèvement minime. C'est ainsi que le glucose libre sera déterminé par la glucose-oxydase, puis en faisant réagir une invertase le glucose libéré par hydrolyse du saccharose deviendra dosable par la glucose-oxydase. Si le milieu renferme en sus du lactose une β-galactosidase libérera du glucose dosable par voie enzymatique et du galactose dosable par une galactose-oxydase spécifique.

RÉPERCUSSIONS DE L'EMPLOI DES ENZYMES SUR L'HYGIÈNE INDUSTRIELLE ET L'HYGIÈNE ALIMENTAIRE

Hygiène industrielle

La production massive d'enzymes exige des précautions spéciales. L'on savait depuis longtemps que les personnes chargées d'éplucher les pancréas devaient se protéger les mains ; sinon les protéases digéraient à la longue leur peau et avivaient

les plaies. Les ouvriers maniant des protéases doivent protéger leurs voies respiratoires contre les poussières de ces enzymes, des irritations nasales et de graves troubles pulmonaires, des allergies sont susceptibles de se développer. Aussi les manipulateurs de protéases doivent-ils se protéger par des masques, gants, vêtements spéciaux, et prendre un peu l'apparence de cosmonautes.

Hygiène alimentaire

Il est absolument indispensable que les enzymes introduites dans les aliments ne soient pas nocives pour le consommateur. Il est aussi indispensable que les enzymes utilisées pour la confection d'aliments puis inactivées ensuite par chauffage n'abandonnent pas dans ces aliments des substances nocives.

Ces problèmes ont retenu l'attention des organismes scientifiques consultés par les Pouvoirs publics au sujet de l'hygiène alimentaire.

En France, un arrêté du Ministre de l'Agriculture, en date du 15 octobre 1957, avait autorisé l'emploi d'enzymes pectinolytiques pour la clarification des cidres et des poirés. Un second arrêté du 31 juillet 1964 a étendu les possibilités d'emploi des enzymes. Il autorise dans les industries de la biscuiterie, des sirops et des jus de fruits et légumes l'emploi d'enzymes amylolytiques, protéolytiques et pectiques ou de leurs mélanges, provenant de cultures de *Bacillus subtilis*.

En juillet 1969 la Section de l'Alimentation du Conseil supérieur d'Hygiène publique de France n'avait pas vu d'objection à ce que l'on adjoigne les préparations de divers *Aspergillus* et Basidiomycètes.

La Commission de l'Alimentation de l'Académie nationale de Médecine fut alors consultée ; son rapport a été adopté par l'Académie lors de la séance du 12 janvier 1971 (16).

Devant le développement de l'emploi des enzymes dans les industries alimentaires, la Commission proposa de fixer dès maintenant des normes générales pour les préparations enzymatiques plutôt que d'accroître continuellement la liste des espèces autorisées.

Il était suggéré au Ministre de l'Agriculture d'élaborer un arrêté s'inspirant du projet de norme générale pour les préparations enzymatiques commerciales destinées au traitement des aliments. Ce projet a été établi par le Comité du Codex sur les additifs alimentaires dans le cadre du programme mixte élaboré par l'Organisation pour l'Agriculture et l'Alimentation (F. A. O.) et l'Organisation Mondiale de la Santé (W. H. O.).

Les préparations enzymatiques utilisées devraient répondre à un certain nombre de critères.

1° Lorsque la réglementation autorise leur emploi, ne pas les utiliser en quantités dépassant celle qui est strictement nécessaire pour obtenir l'effet désiré.

2° Obtention à partir de microorganismes réputés non pathogènes pour l'Homme, ou d'animaux sains, ou de végétaux de bonne qualité.

3° Utilisation de milieux de culture dont les constituants ne laissent pas de résidus nocifs pour l'Homme.

4° Absence dans les préparations utilisées d'impuretés nocives pour l'Homme et de microorganismes pathogènes ou toxiques.

Ce dernier point pose un problème plus général qui est aussi étudié par une Commission de la Pharmacopée européenne à Strasbourg. Quels sont les micro-organismes que l'on peut tolérer dans les médicaments et les aliments ? Quelle proportion maximum peut-on admettre ? Quelle est la liste des microorganismes dont l'absence doit être exigée impérieusement ?

Un accord sur ces points n'a pas été définitivement établi car il exige préalablement des expérimentations actuellement en cours.

Dans les conditions présentes, le Conseil d'Hygiène et l'Académie de Médecine ont considéré que certains agents conservateurs pouvaient être adjoints aux préparations enzymatiques. Les agents conservateurs ci-après désignés leur ont paru admissibles : acide sorbique et ses sels de sodium, potassium, calcium ; acide benzoïque et son sel de sodium, sels sodiques des esters éthylique ou propylique de l'acide parahydroxybenzoïque.

La proportion d'agents conservateurs ne devant pas dépasser un pour cent du poids de la préparation enzymatique à l'état sec.

Enfin, le glucitol, anciennement dénommé sorbitol, peut être utilisé pour faciliter l'homogénéisation de la préparation ; la proportion de glucitol pouvant atteindre 60 p. 100 dans cette préparation. Comme le recommande l'Académie de Médecine, « il est à souhaiter que les progrès de la technologie industrielle permettent, dans un avenir proche, de ne plus avoir recours à des stabilisants pour les préparations enzymatiques utilisées dans certaines industries alimentaires ».

Le vaste programme de ce symposium confirme l'importance du sujet traité, il autorise à considérer que ce vœu de l'Académie de Médecine n'est pas utopique. La technologie des enzymes s'améliore chaque jour ; les enzymes sont des additifs alimentaires biologiques au même titre que les aliments sont des produits biologiques.

Nous terminerons sur une note tout à fait optimiste, car les enzymes vont contribuer à nous permettre d'améliorer la qualité et aussi la saveur de multiples substances alimentaires.

Il n'est pas d'usage de proposer des conclusions dans une conférence préliminaire ; s'il en faut absolument une, nous suggérons la phrase optimiste précédente.

SUMMARY

EVOLUTION AND NEW PERSPECTIVES OF USE OF ENZYMES IN THE AGRICULTURAL AND FOOD INDUSTRIES

Historical from the empiric use of the enzymes to their rational use.

A very promising new method is the use of enzymes attached to an insoluble support, the polymer supporting the enzyme can be easily withdrawn from the medium and used again.

Two fundamental properties of enzymes are basic to the extension of their uses : *a*) the specificity of action, *b*) the capacity to react at a moderate temperature which does not harm the other constituents of the food.

Depolymerases remain the preparations with the widest variety of uses : amylases, cellulases, hemicellulases, pectinases and proteases in particular. Many préparations contain, moreover several associated enzymes of the same group.

Various purified enzymes with a more defined use have now been added : α-galactosidase, glucose-oxydase, etc.. There is likely to be a tendency towards the use of relatively purified preparations.

The manufacture of enzymes in great quantity has raised various problems concerning workhealth.

In several countries the official authorities, when codifying legislation in matter of food, formulate compulsory criteria for the authorization of use of enzymatic preparations in the manufacture of food and beverages.

ZUSAMMENFASSUNG

ENTWICKLUNG UND NEUE PERSPEKTIVEN FÜR DIE ANWENDUNG VON ENZYMEN IN DEN LANDWIRTSCHAFTS- UND ERNÄEHRUNGSINDUSTRIEN

Die Geschichte der empirischen Enzymanwendung bis zu ihrer rationnellen Anwendung.

Ein neuer, vielversprechender Weg ist Anwendung von auf einem unlöslichen Träger gebundenen Enzymen, wobei der das Enzym tragende Polymer leicht aus dem Milieu entfernt und neu benutzt werden kann.

Zwei grundlegende Eigenschaften der Enzyme sind die Basis für ihre zunehmende Verbreitung : *a*) Spezifizität seiner Wirkung, *b*) Möglichkeit auch bei gemässigter Temperatur wirksam zu sein, was eine Schonung der anderen, das Lebensmittel bildenden Substanzen bedeutet.

Die vielseitig benutzten Präparate sind die Depolymerasen : Amylasen, Zellulasen, Hemizellulasen, Pektinasen und insbesondere Proteasen. Viele Präparate enthalten übrigens mehrere Enzyme derselben Gruppe.

Dazu kommen jetzt noch gereinigte Enzyme, deren Anwendung begrenzter ist : α-Galaktosidase, Glukose-Oxydase, usw. Die Entwicklungstendenz geht hier wahrscheinlich zum Gebrauch von relativ gereinigten Präparationen.

Die Herstellung grosser Mengen von Enzymen hat der Arbeitsmedizin verschiedene Probleme gestellt.

In mehreren Ländern bestehen offizielle Dienststellen die mit der Ausarbeitung der Lebensmittelgesetzgebung beauftragt sind, Sie beschäftigen sich mit der Festlegung von Kriterien für den Gebrauch, von Enzym-Präparaten bei der Herstellung von Lebensmitteln und Getränken.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Stephanopoulos O., 1963. Confirmation expérimentale des théories d'Aristote sur la biocatalyse *Pathol. et Biol.*, **11**, 246.

(2) Fleury P., 1933. De la diastase de Payen aux diastases actuelles. *Vol. du IVe Congrès de Chimie biologique*. Masson Édit., Paris, 174-209.

(3) Pénau H. Les diastases et leurs applications industrielles. *Ibid.*, 228-286.

(4) Holme T., Arvidson S., Lindholm B., Pavlu B., 1969. Enzymes, Laboratory, scale Production. *Process Biochemistry*, 62-66.

(5) Crook E. M., Brocklehurst K., Wharton C. W., 1970. Cellulose insolubilized enzymes, in *Methods in Enzymology*. Ed. Colowick S. P. et Kaplan N. O. Academic Press, New York, **19**, 963-978.

(6) Brown E., Racois A., 1971. Les enzymes insolubilisées. *Bull. Soc. Chim. France*, 4613-4617.

(7) Dahlqvist A., 1967. Intestinal disaccharidases and disaccharide intolerance. *Bull. Soc. Chim Biol.*, **49**, 1635-1646.

(8) Courtois J.-É., 1968. Les disaccharidases, in Girard M.-L. : *Problèmes actuels de Biochimie appliquée*. Masson édit., Paris, **2**, 107-151.

(9) Dahlqvist A., 1971. General Aspects on Intestinal enzymes. Function and alteration in pathological conditions. *Skandia International symposia. Regional Enteritis* (Crohns Disease). Nordiska Bokhandelns Forlag. Edit. Stockholm, 303-313.

(10) Dahlqvist A., Lindquist B., 1971. Lactose intolerance and protein malnutrition. *Acta Poediat. Scand.*, **60**, 488-494.

(11) Suzuki H., Ozawa Y., Oota H., Yoshida H., 1969. Studies on the decomposition of raffinose by α-galactosidase of mold. *Agr. Biol. Chem. Japan*, **33**, 501-513.

(12) Courtois J.-É., 1968. Quelques aspects de la biochimie des cellulases et hémicellulases. *An. real Acad. Farm. Madrid*, **34**, 3-32.

(13) Courtois J.-É., Bui Khac Diep, 1965. Recherches sur le dosage des cellulases et hémicellulases dans les préparations pharmaceutiques. I. Considérations générales et position du problème. *Ann. Pharm. Fr.*, **23**, 533-549.

(14) Courtois J.-É., Chararas C., Debris M.-M., Laurant-Hubé H., 1965. Répartition comparée des osidases chez les insectes xylophages parasites des arbres forestiers. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 2219-2231.

(15) Marshall J. J., Whelan W. J., 1971. A new approach to the use of enzymes in starch technology. *Chem. and Ind.*, 701-702.

(16) Courtois J.-É., 1971. Rapport (au nom de la Commission de l'Alimentation), sur une demande du Ministère de l'Agriculture en vue de l'emploi de préparations enzymatiques dans certaines industries alimentaires. *Bull. Acad. nat. Médecine*, **155**, 33-36.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 237-252.

EMPLOI DES ENZYMES DANS LES INDUSTRIES DE CUISSON DES PRODUITS A BASE DE CÉRÉALES

A. GUILBOT

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., 91305 Massy

RÉSUMÉ

Les industries de cuisson des produits à base de céréales sont parmi les premières à avoir utilisé l'addition de préparations enzymatiques. Ce sont d'abord le malt et des extraits de culture de moisissures qui ont servi, spécialement lorsque les farines de blé étaient trop pauvres en alpha-amylase ou présentaient une force boulangère trop importante. Ces extraits contenaient, en plus des amylases et des protéases dont les effets étaient recherchés, de nombreux autres systèmes enzymatiques ayant une action bénéfique ou néfaste.

Progressivement, il a été possible de préciser et de maîtriser le rôle de certaines des enzymes intervenant dans ces industries. De plus, au fur et à mesure que les fabrications passaient du stade artisanal au stade industriel et tendaient vers le mécanisation et l'automatisation des procédés, il s'est avéré indispensable d'utiliser des matières premières présentant des caractéristiques constantes ou pouvant être facilement corrigées par addition d'enzymes appropriées. Cela impose de pouvoir disposer de préparations enzymatiques ne possédant qu'un seul type d'activité d'efficacité connue.

Ce sont d'abord les alpha-amylases d'origine et de caractéristiques variées, puis les protéases qui ont été étudiées et purifiées pour répondre à ces impératifs. Depuis peu, l'action de nouvelles alpha-glucanases et de préparations de pentosanases et de cellulases est en cours d'étude.

En dehors de ces hydrolases, l'intérêt s'est porté récemment sur l'emploi d'oxydo-réductase (lipoxygénase, glucose-oxydase, catalase) qui jouent un rôle important en panification.

Des mises au point assez récentes ont été faites sur ces sujets. Aussi, après avoir brièvement rappelé l'action de ces diverses enzymes sur la facilité de préparation et les caractéristiques des produits finis, on insistera plus spécialement sur les répercussions, vis-à-vis des caractéristiques de ces enzymes et de leur modalité d'emploi :

— d'une part, des types de matières premières employées et des produits préparés ;
— d'autre part, de l'évolution des techniques vers l'automatisation, la rapidité et la rentabilité optimale ;
— enfin, de la nécessité de fabriquer et de promouvoir des produits nouveaux.

INTRODUCTION

Les industries de cuisson des produits à base de céréales sont sans doute parmi les premières à avoir utilisé l'addition de préparations enzymatiques. L'usage du malt remonte, en effet, à la plus haute antiquité. Faut-il rappeler, par ailleurs, qu'en 1830 DUBRUNFAUT fut le premier à montrer qu'un extrait de malt est capable

de transformer l'amidon en sucres et que, peu après, PAYEN et PERSOZ (1833) obtinrent à partir du malt un produit actif pour cette hydrolyse de l'amidon qu'ils appelèrent diastase.

Ce sont aussi des Français (BOIDIN et EFFRONT, 1914) qui ont été les premiers à décrire la production commerciale d'enzymes à partir de moisissures et de bactéries. Mais il semble que l'emploi d'enzymes fongiques dans les industries de cuisson ait été tenté d'abord au Japon avec des résultats du reste assez peu satisfaisants. Il a fallu ensuite de nombreuses années avant que la Compagnie Rohm et Haas de Philadelphie (1936) essaie de nouveau, cette fois avec succès, l'utilisation d'enzymes bactériennes ou fongiques dans les industries de cuisson.

L'industrialisation de la fabrication de produits traditionnels tels que le pain et les biscuits exige en effet la constance de la production, ce qui implique que l'on puisse corriger les fluctuations des caractéristiques des matières premières. Ce résultat peut être obtenu, soit par addition d'agents chimiques, soit par l'emploi des enzymes. Ces dernières présentent l'intérêt d'être des constituants normaux des produits biologiques, d'avoir une action plus ménagée et d'être plus thermolabiles.

Plusieurs mises au point ont été faites en ce qui concerne les enzymes et leur rôle dans les industries de cuisson : d'abord, en 1946, par ANDERSON, puis par JOHNSON (1965), REED (1966) et, en France, dans le cadre des journées du C. N. E. R. N. A. (1967) sur l'Utilisation des Enzymes dans les Industries alimentaires. En 1969, PYLER a présenté une revue sur l'aspect théorique et pratique de l'action des enzymes en panification. Enfin, en 1970, différents rapports ont été présentés sur ce thème (SHELLENBERGER ; JANICKI ; CAWLEY ; GUILBOT et DRAPRON ; BUSHUK, KAMINSKI et CHUA) lors du Ve Congrès mondial des Céréales et du Pain. Il n'est donc pas dans notre intention de faire une revue exhaustive de l'emploi des enzymes en panification et dans les autres industries de cuisson (plus spécialement biscotterie-biscuiterie).

Après avoir rappelé les principales étapes de la transformation des farines en panification, nous allons d'abord indiquer les différents types d'enzymes ou de préparations enzymatiques actuellement utilisés dans ces industries, leur rôle au cours des processus de transformation et les effets qu'ils provoquent sur les caractéristiques des produits finis. Puis, nous nous efforcerons de dégager les principaux problèmes que pose l'utilisation de ces enzymes, compte tenu des matières premières utilisées, de l'évolution des modes de fabrication vers la rapidité, l'automatisation et la rentabilité, et des types de produits finis. Nous évoquerons les études qui sont encore nécessaires pour aboutir à un résultat optimum, ainsi que les spécifications indispensables au niveau des caractéristiques des préparations industrielles d'enzymes.

PRINCIPALES PHASES ET ÉVOLUTION D'UNE FABRICATION TYPE : LA PANIFICATION

La panification comporte essentiellement les différentes opérations suivantes :

— le pétrissage, qui permet d'obtenir une pâte d'un certaine consistance à partir de farine, d'eau, et de divers ingrédients, généralement sel et levure ;

— les fermentations, la division, la pesée et le façonnage de la pâte ; pendant toute

cette période, la température reste voisine de 25°C et les phénomènes essentiels sont la formation d'un réseau glutineux tridimensionnel et la formation de gaz carbonique par la levure, à partir des sucres préexistants ou formés au cours de l'amylolyse ;
— vient ensuite une phase de cuisson pendant laquelle la température de la mie peut atteindre 100°C ; les protéines sont alors dénaturées, l'amidon partiellement empesé, la structure du produit est figée ;
— enfin, on arrive au stade de refroidissement et de stockage du pain.

Il s'agit en fait d'aboutir à une pâte, suffisamment développée, généralement, par fermentation, qui, après cuisson, fournira un pain ayant un volume optimum dont la mie sera bien alvéolée, dont la croûte présentera une coloration agréable à l'œil et dont les caractères organoleptiques seront satisfaisants pour le consommateur.

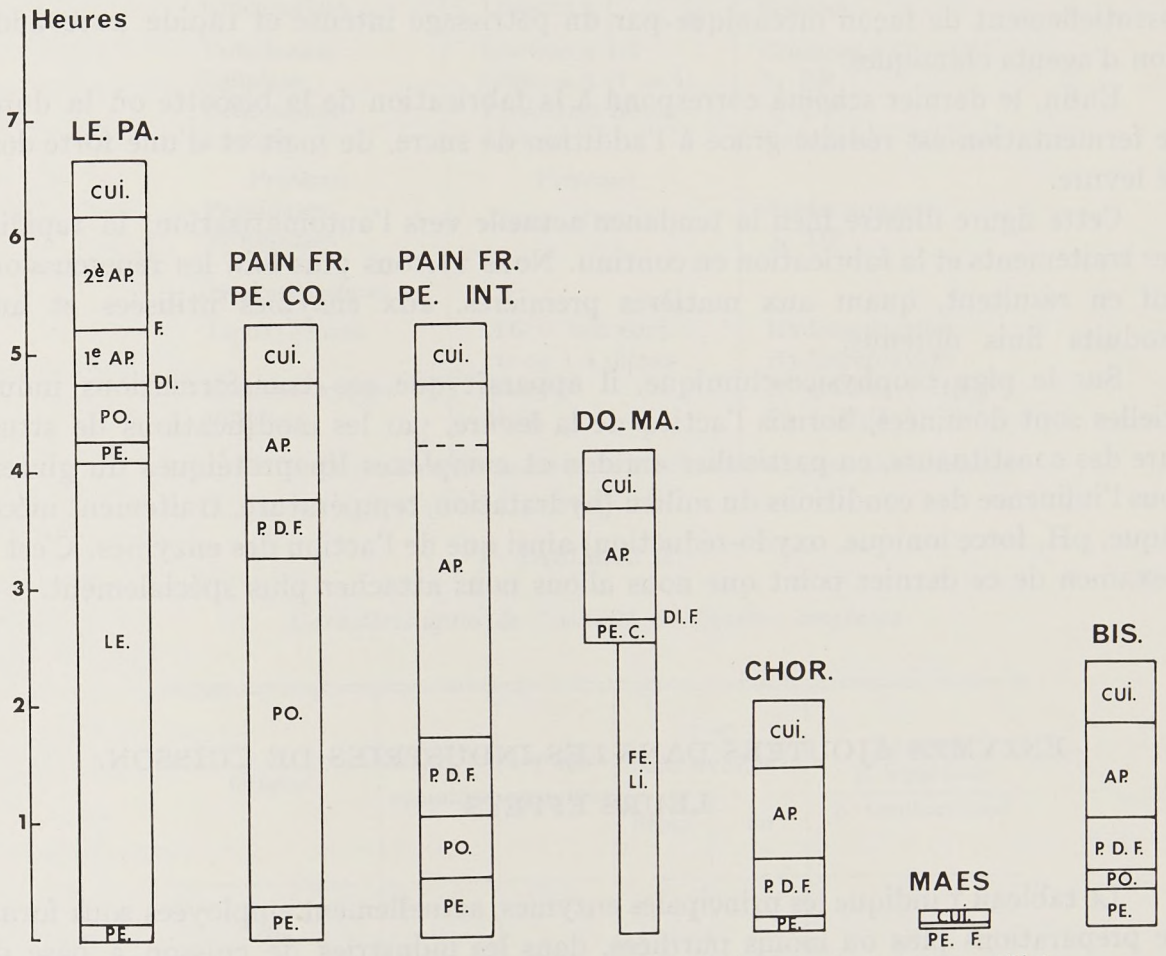


FIG. 1. — *Évolution du temps nécessaire à la panification selon les processus utilisés*

LE. PA. : Levain-Pâte ; PAIN FR. PE. CO., PE. INT. : Pain français, Pétrissage conventionnel, Pétrissage intensifié ; DO-MA. : Do-Maker ; CHOR. : Chorleywoord ; BIS. : Biscotterie. PE. C. : Pétrissage continu ; LE. : Levain-Levure ; FE. LI. : Fermentation liquide ; PR. : Pointage ou 1re Fermentation ; DI. : Division de la pâte ; P. : Pesée ; 1er AP ou D. : 1er Apprêt ou Fermentation intermédiaire ou détente ; 2e AP ou AAP. : Fermentation finale ; F. : Façonnage, mise en forme ; CUI : Cuisson.

La figure 1 schématise les différentes étapes précédemment indiquées et montre l'évolution très grande que l'on observe actuellement dans cette fabrication.

Le premier schéma concerne la panification conventionnelle de type américain, avec préparation d'un levain à base de farine, levure et divers ingrédients, qui est

ensuite pétri avec le reste de farine et d'ingrédients ; la pâte subit alors différents stades de fermentation avec découpage et mise en forme avant la cuisson.

Les second et troisième schémas concernant deux types de panification française actuellement utilisés, avec pétrissage conventionnel ou intensifié, et addition directe de levure lors du pétrissage.

Dans le procédé avec pétrissage en continu, on utilise — quatrième schéma — un « brassin » liquide préfermenté qui est mélangé en continu avec la farine ; la pâte résultante subissant une courte fermentation avant cuisson.

Le procédé Chorleywood (cinquième schéma) fait intervenir une action mécanique très intense au cours du pétrissage, avec adjonction d'oxydants, ce qui permet de raccourcir le temps de fermentation avant cuisson (Elton, 1968).

Le sixième schéma représente le procédé mis au point par Maes (1967) dans lequel toute fermentation est supprimée, le développement de la pâte étant obtenu essentiellement de façon mécanique par un pétrissage intense et rapide avec addition d'agents chimiques.

Enfin, le dernier schéma correspond à la fabrication de la biscotte où la durée de fermentation est réduite grâce à l'addition de sucre, de malt et d'une forte dose de levure.

Cette figure illustre bien la tendance actuelle vers l'automatisation, la rapidité des traitements et la fabrication en continu. Nous verrons plus loin les répercussions qui en résultent, quant aux matières premières, aux enzymes utilisées et aux produits finis obtenus.

Sur le plan biophysico-chimique, il apparaît que ces transformations industrielles sont dominées, hormis l'action de la levure, par les modifications de structure des constituants, en particulier amidon et complexes lipoprotéiques du gluten, sous l'influence des conditions du milieu (hydratation, température, traitement mécanique, pH, force ionique, oxydo-réduction) ainsi que de l'action des enzymes. C'est à l'examen de ce dernier point que nous allons nous attacher plus spécialement.

ENZYMES AJOUTÉES DANS LES INDUSTRIES DE CUISSON. LEURS EFFETS

Le tableau I indique les principales enzymes, actuellement employées sous forme de préparations plus ou moins purifiées, dans les industries de cuisson à base de céréales. Elles se classent en deux grands groupes : les hydrolases et les oxydo-réductases.

Hydrolases

a) *Glycohydrolases.*

Dans le groupe des hydrolases, on distingue les glycohydrolases, dont l'alpha- et la bêta-amylases du blé sont des représentantes. Rappelons que ces enzymes agissent sur l'amidon en rompant les liaisons α (1 $\rightarrow$ 4) soit à partir des bouts de chaînes (β-amylase) en donnant de petites molécules — maltose, glucose — soit au hasard,

TABLEAU I

Principales enzymes utilisées dans les industries de cuisson à base de céréales

Types d'enzymes	*Substrat* Mode d'hydrolyse	Produits formés
Hydrolases		
Glycohydrolases		
Alpha-amylase	*Amidon*	
• Du malt	Liaisons α (1 → 4)	Glucose
• Fongique		Maltose
• Bactérienne		Maltotriose..
		Dextrines
Glucamylase	Liaisons α (1 → 4 ; 1 → 6)	Glucose
Pullulanase	Liaisons α 1-6	Glucanes α (1 → 4)
Cellulase	*Cellulose* β (1 → 4)	↘ DP
Pentosanase	*Pentosanes* insol.	↘ DP
Lactase	*Lactose*	Galactose + Glucose
Protéases	*Protéines*	
Peptidases	—CO—NH—	Acides aminés
Protéinases		↘ DP
Oxydo-réductases		
Lipoxygénase	*AG* = non conj.	Hydroperoxydes
	cis-cis 1-4 diènes	Hydroperoxydes
Glucose oxydase	*Glucose*	A. glucon. + H_2O_2
Catalase	H_2O_2	O_2 + H_2O

TABLEAU 2

Caractéristiques de l'activité de diverses amylases

Origine	pH optimum	T °C optimum	T °C inactivation		Rapport p. liquéfiant / p. saccharifiant
			début	fin	
Blé					
α-amylase.....	4-5	65	65	90	
β-amylase.....	4-5	55	57	75	
Alpha-amylase					
Fongique	5,0	55	66	79	13,0
Malt	5,0	60	60	80	3,5
Bactérie	7,0	70	79	100	14,0
Glucamylase	4,5	55-60	65	80	

ce qui aboutit à la formation de dextrines ayant un DP plus ou moins élevé. Elles agiront d'abord, avant cuisson, sur les grains d'amidon endommagés au cours de la mouture, puis, en début de cuisson, sur un amidon semi-empesé, avant d'être inactivées par effet thermique.

La farine présente souvent une activité α-amylasique insuffisante, ce qui amène à la supplémenter par addition de malt (le grain germé ayant une activité α-amylasique deux à trois mille fois supérieure à celle du grain au repos). On utilise également des α-amylases d'origine fongique (*Aspergillus oryzae*) et parfois des α-amylases d'origine bactérienne (Miller, Johnson et Palmer, 1953 ; Mercier et Colas, 1967).

On étudie également à l'heure actuelle (Bussière et de la Guérivière, 1972) l'emploi de la glucamylase, capable de rompre les liaisons α (1 → 4) et α (1 → 6) en donnant seulement du glucose, rapidement fermentescible. Des recherches portent aussi sur la pullulanase (Whelan *et al.*, 1971) qui, rompant les liaisons α (1 → 6) déramifie l'amylopectine en fournissant des chaînes linéaires de DP < 60.

Le tableau 2 résume les caractéristiques de l'activité de ces différentes enzymes.

Des essais ont été en outre réalisés avec des complexes enzymatiques renfermant des hémicellulases et des pentosanases, notamment pour la panification du seigle (Rees, 1966 ; Drews, 1971).

La lactase peut également être utilisée dans certains cas, lorsque des produits laitiers sont ajoutés au cours de la panification, libérant ainsi du glucose et du galactose (Reed, 1966).

En bref, les enzymes de ce groupe permettent :

1° de jouer sur la vitesse et l'importance de la fermentation par libération de sucres fermentescibles ;

2° de modifier les caractéristiques rhéologiques des pâtes :
- soit en libérant l'eau absorbée par l'amidon endommagée, du fait de la destruction de celui-ci ;
- soit en modifiant la structure, la solubilité et les propriétés mécaniques des polyholosides (amidon, hémicelluloses, pentosanes) à la température ordinaire ou en début de cuisson leur action s'accentuant alors avant d'être bloquée par la chaleur.

Il en résulte diverses modifications des caractéristiques du produit fini. Il est ainsi possible :

- d'augmenter le volume du pain, d'accentuer la souplesse, le moelleux de la mie et même de la rendre collante, si l'action est trop importante ;
- d'accentuer la coloration de la croûte par réaction de Maillard et caramélisation ;
- d'intervenir aussi sur le goût et l'arôme du pain (produits de fermentation, produits de réactions de Maillard, sucre résiduel) ;
- de diminuer enfin la vitesse de raffermissement de la mie et de pallier ainsi, en partie, l'effet du rassissement, par emploi d'amylase bactérienne dont l'activité n'est pas complètement détruite après cuisson, (Silberstein, 1964).

b) *Protéases.*

Les protéases attaquent les liaisons peptidiques des protéines et des peptides. Les exopeptidases libèrent les acides aminés en bout de chaîne, alors que les endo-

peptidases sont capables de couper les liaisons peptidiques à l'intérieur des longues chaînes protéiques en libérant des fragments de dimensions moléculaires encore importantes. Les protéases utilisées en panification sont généralement moins bien connues que les glucosidases.

Les protéases peuvent être originaires du malt, le grain germé ayant une activité environ 15 fois plus grande que celle du grain au repos (Mounfield, 1936 ; Hildebrand et Burkert, 1942) ; elles sont souvent d'origine fongique ou bactérienne.

Leur rôle essentiel porte sur la modification du réseau du gluten et sur la formation d'une certaine quantité d'acides aminés et de peptides à courte chaîne. Ces enzymes ont pour effet de modifier les caractères rhéologiques des pâtes, en diminuant leur consistance. L'énergie dépensée au cours du pétrissage sera plus faible ; l'opération sera plus rapide. L'aptitude des pâtes aux traitements mécaniques de façonnage, laminage, feuillage peut ainsi être améliorée ; la durée de fermentation raccourcie et la rétention gazeuse plus importante (Petit et Audidier, 1967).

Au niveau du produit fini, l'effet des protéases portera sur la couleur de la croûte et l'arôme du produit (réaction de Maillard) (El Dash et Johnson, 1967) ; il permettra d'escompter des améliorations de la densité, du grain, de la texture, de la tendreté ou du moelleux des produits.

Oxydo-réductases

Enfin, certaines oxydo-réductases sont utilisées depuis quelques années ou sont en cours d'étude.

Citons la lipoxygénase, formant des hydroperoxydes instables à partir des acides gras poly-insaturés tels que l'acide linoléique (Drapron et Uzzan, 1968) ; la glucose-oxydase catalysant la transformation du glucose en acide gluconique, avec formation d'eau oxygénée (Polyak et Linetskaya, 1968).

Les produits résultant de l'action de la lipoxygénase oxydent les pigments caroténoïdes et provoquent le blanchiment de la mie ; ils peuvent accroître la ténacité du gluten, soit par oxydation des groupements —SH ou des sites de liaison protéines-lipides, ce qui libèrerait ces derniers (Daniels, Frazier et Wood, 1971). Cet effet se répercute sur le volume du pain qui peut être presque doublé en passant du pétrissage conventionnel au pétrissage intensifié en présence de petites quantités de farine de fèves riches en lipoxygénase. En outre, la décomposition des hydroperoxydes aboutit à la formation de produits volatils aromatiques (hexanal en particulier) qui peuvent être jugés souhaitables ou indésirables par le consommateur (Drapron, 1969).

PROBLÈMES POSÉS PAR L'OPTIMISATION DE L'EMPLOI DES ENZYMES

Même si on s'en tient à un seul type de produit tel que le pain, de nombreux facteurs sont à prendre en considération pour définir l'utilisation optimale des enzymes, afin de corriger les caractéristiques des matières premières, de faciliter ainsi la mécanisation des processus de transformation et d'obtenir, dans les conditions les plus économiques, un produit satisfaisant pour le consommateur.

Influence des caractéristiques des matières premières

Les farines utilisées présentent des propriétés très différentes suivant les variétés de blés, leurs conditions de culture, et les procédés de mouture mise en œuvre.

C'est ainsi que les blés européens peuvent être très amylasiques s'ils sont récoltés en période humide et que, dans ces conditions, l'addition d'alpha-amylase est non seulement inutile mais dangereuse, car elle aboutit à la production d'un pain à la mie collante. Le problème qui se pose alors est d'inhiber partiellement cette enzyme, mais il n'est pas encore résolu (Cawley et Mitchell, 1968 ; Palla et Verrier, 1972). Les blés des États-Unis et d'Europe Centrale sont au contraire souvent pauvres en α-amylase, ce qui justifie l'addition d'amylase fongique ou du malt pour aboutir à une activité optimale, (Reed, 1966).

La texture du blé et les conditions de mouture peuvent avoir également une grande importance. C'est ainsi que les blés vitreux fournissent plus d'amidon endommagé que les blés farineux, ce qui augmente sensiblement la quantité de substrat accessible à la β-amylase et peut rendre moins nécessaire la supplémentation en α-amylase. On conçoit le rôle important que peut avoir le taux d'amidon endommagé d'une farine, dans la mesure où il constitue le facteur limitant de l'amylolyse (Jones, 1940).

Par ailleurs, les blés américains ont généralement une force boulangère importante du fait de la quantité de gluten qu'ils contiennent et de la ténacité de celui-ci. C'est par l'addition de protéases que l'on peut assouplir le réseau glutineux, surtout si la farine a été en outre traitée aux oxydants, qui ont pour effet d'accroître encore la ténacité du gluten. Par contre, en panification française, utilisant des blés faibles, l'emploi de protéases ne paraît pas s'imposer avec le mode de fabrication actuel.

D'une façon générale, pour être en mesure d'aboutir à un emploi optimum des enzymes, il est nécessaire d'être renseigné sur les systèmes enzymatiques que renferment les matières premières, en particulier les farines, sur la présence d'effecteurs, la nature et l'état des substrats potentiels.

Or, si l'état de nos connaissances est assez avancé dans le cas des amylases, il reste très fragmentaire sur les protéases. Ainsi, récemment encore, Bushuk, Kaminski et Chua (1970) ont confirmé qu'une grande partie de l'activité protéolytique des farines n'est pas du type papaïne, contrairement aux idées qui avaient prévalu pendant plus de 30 ans ; et Maes, Van den Driessche, Bernaerts, (1955) estiment qu'une partie des protéases de la farine pourrait être d'origine microbienne. Malgré les progrès remarquables accomplis cette dernière décennie, bien des points restent encore à préciser sur les constituants protéiques des farines et leur dégradation par les enzymes (Crozet, de Pastors, Petit, 1971). De même, certains systèmes oxydo-réducteurs des farines sont encore assez mal connus.

Influence du processus de transformation. Cas de la panification

Les formules des pâtes sont également un facteur important. On conçoit facilement que, selon la dose de levure, et avec l'emploi de sucre courant dans les pays anglo-saxons, les quantités d'amylase à ajouter puissent être différentes.

Le moment d'addition du sel est également très important. Le chlorure de sodium freine en effet la fermentation panaire ; il inhibe partiellement le blanchiment par

la lipoxygénase, en présence de purothionine ; il diminue aussi l'intensité de la protéolyse en modifiant la structure du substrat (MILLER et JOHNSON, 1948 ; ROITER et BERZINA, 1963) ; par contre, il semble activer l'action de l'amylase fongique (WEITH, 1963).

Par ailleurs, il est évident que l'emploi des enzymes sera différent selon le schéma de panification adopté parmi ceux que nous avons présentés.

Si, par exemple, on fait appel à la fermentation directe de la pâte par la levure, l'activité des amylases devra être d'autant plus grande que la durée de cette étape sera courte et la quantité de levure importante. Si le développement de la pâte est obtenu en partie mécaniquement, l'addition de protéases permettra de diminuer la durée de pétrissage et l'énergie dépensée, (WALDT, 1965 ; GROSS *et al.*, 1967). Cependant, dans le cas d'un développement de la pâte exclusivement mécanique, les agents chimiques à action rapide seront sans doute plus efficaces que les enzymes. Mais on peut aussi conjuguer les traitements chimiques et enzymatiques.

Un simple changement dans l'intensité du pétrissage peut par ailleurs modifier complètement l'importance de l'effet de certaines enzymes en raison d'une plus grande incorporation d'air et du renouvellement plus important des surfaces. C'est le cas observé en France, pour l'action de la lipoxygénase de la farine de fèves (fig. 2 et fig. 3) ; (DRAPRON *et al.*, 1971).

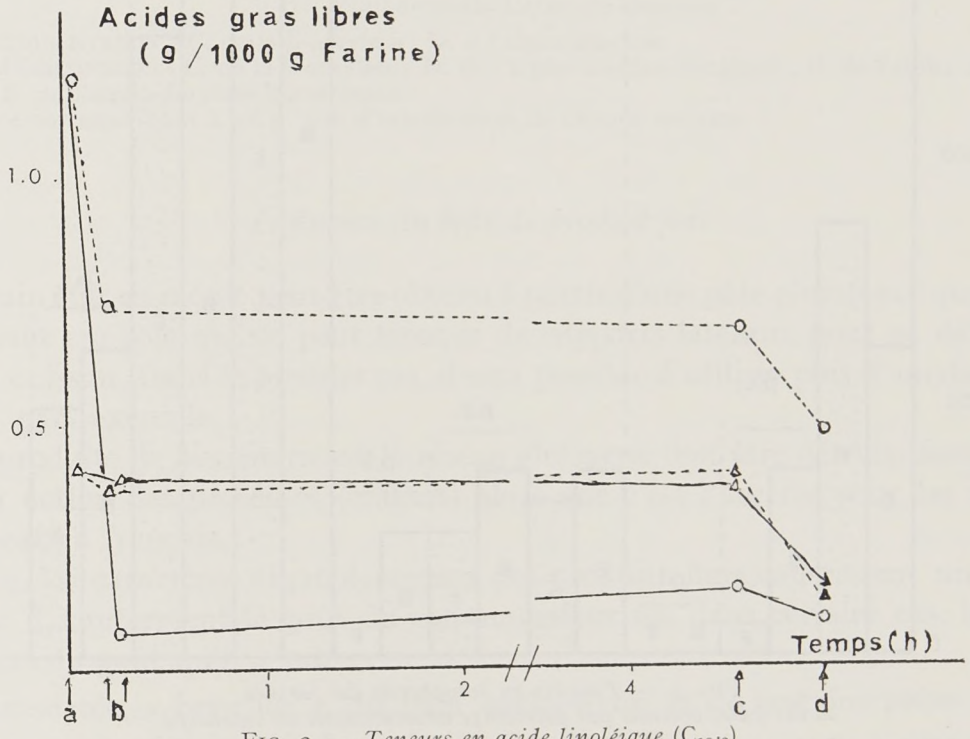


FIG. 2. — *Teneurs en acide linoléique* ($C_{18:2}$) *et palmitique* (C_{16}) *libres des milieux correspondant aux différents stades de la panification*

a) : Farine initiale ; *b* : Pâte après pétrissage ; *c* : Pâte après fermentation ; *d* : Mie de pain après cuisson. Pétrissage conventionnel : - - - ○ - - - - ○ - - - ($C_{18:2}$) ; - - - △ - - - - △ - - - (C_{16}).
Pétrissage intensifié : —— ○ —— ○ —— ($C_{18:2}$) ; —— △ —— △ —— (C_{16}).

Enfin, les conditions de cuisson et la forme du pain peuvent jouer un rôle déterminant sur l'action des amylases et la texture de la mie en raison de la différence de vitesse de montée en température de la périphérie vers le centre du pain (fig. 4) ; (DRAPRON, 1961 ; AUDIDIER, 1966 et 1968).

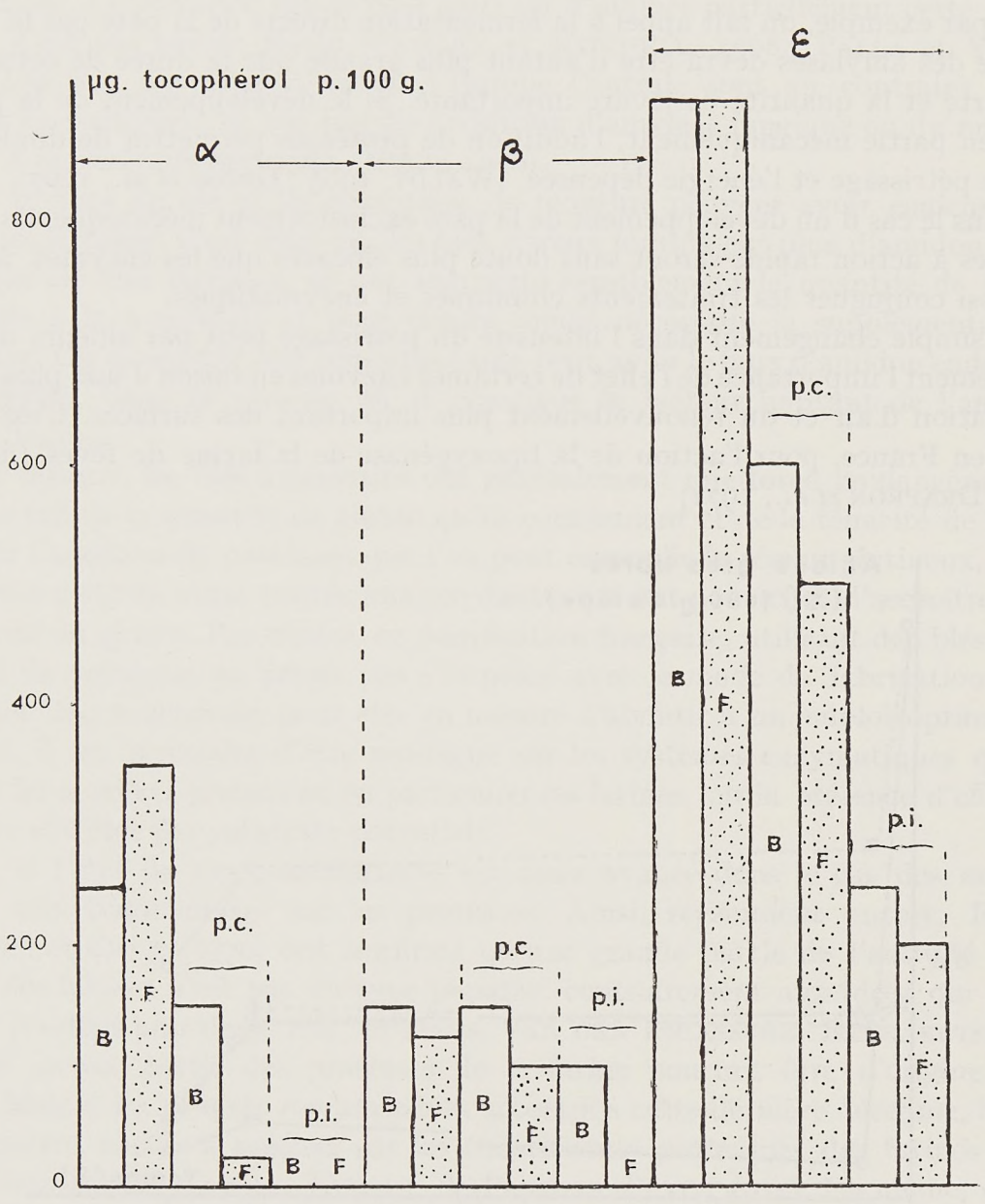


FIG. 3. — *Teneurs en tocopherols des farines et des pâtes obtenus par pétrissage conventionnel ou intensifié*

B : farine de blé seule, F : farine de blé + farine de fève ; p. c. : pétrissage conventionnel ; p. i. : pétrissage intensifié.

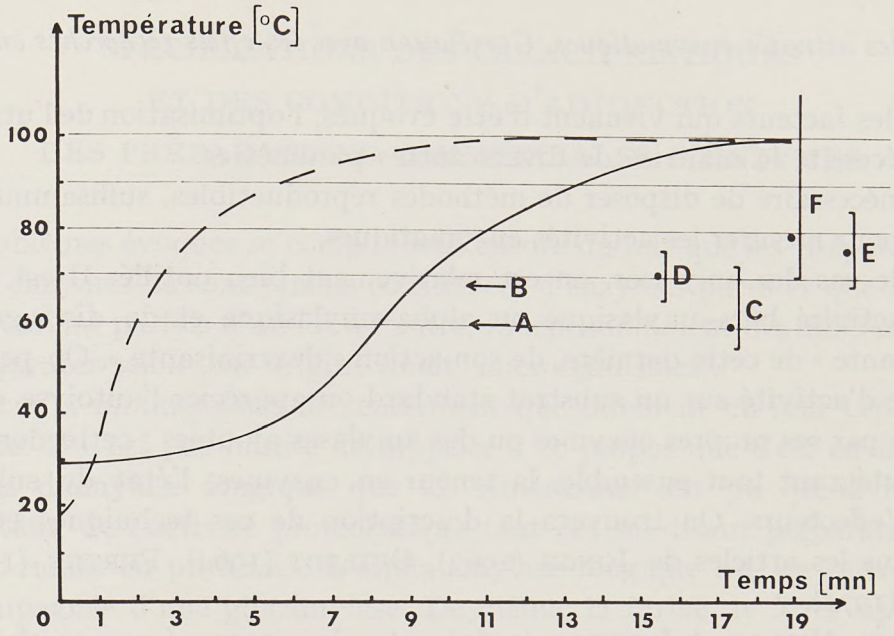


FIG. 4. — *Cinétiques thermiques internes de divers produits de cuisson et zones de températures correspondant à des modifications de certains composants du milieu*

——— pain français Parisien
——— pain biscotte
A : inactivation de la levure
B : début de gélatinisation de l'amidon

Zones d'inactivation : C. de la β-amylase ; D. d l'alpha-amylase
Zones d'inactivation : C. de la β-amylase ; D. de l'alpha amylase fongique ; E. de l'alpha-amylase de malt ; F. de l'alpha-amylase bactérienne.
• repère correspondant à 50 p. 100 d'inactivation de chaque enzyme.

Influence du type de produit fini

Le pain cuit en moule peut être obtenu à partir d'une pâte plus douce que le pain français cuit sur sole qui ne peut trouver de supports latéraux pour se développer lors de la cuisson. Dans le premier cas, il sera possible d'utiliser plus d'amylase et de protéase par exemple.

Les produits de biscuiterie où le réseau glutineux doit être détruit, seront améliorés par action des protéases (crakers) alors que c'est l'inverse pour les produits de panification français.

Enfin, les caractères organoleptiques des produits finis constituent un facteur dominant. Là intervient le goût du consommateur ou, dans certains cas, le conditionnement du goût qu'il a subi :

— saveur sucrée, « briochée », du pain anglo-saxon et de certains pains de mie, par rapport à celui du pain français ;
— odeurs dues à l'effet de la lipoxygénase jugées agréables par les uns et désagréables par d'autres ; (DRAPRON, 1969 ; KLEINSCHMIDT *et al.*, 1963)
— texture de mie à alvéolage fin et régulier ou au contraire à trous plus gros et moins réguliers ;
— rapport volume/surface différent, modifiant la proportion de croûte et la texture de la mie (cas de la baguette et du gros pain).

Mesure des activités enzymatiques. Corrélation avec les effets recherchés en pratique

Outre les facteurs qui viennent d'être évoqués, l'optimisation de l'utilisation des enzymes nécessite la maîtrise de divers autres paramètres.

Il est nécessaire de disposer de méthodes reproductibles, suffisamment précises et rapides pour mesurer les activités enzymatiques.

Dans le cas des amylases, on est relativement bien outillé. Il est possible de mesurer l'activité bêta-amylasique ou alpha-amylasique et de distinguer l'action « saccharifiante » de cette dernière, de son action « dextrinisante ». On peut effectuer une mesure d'activité sur un substrat standard ou apprécier l'autolyse de l'amidon de la farine par ses propres enzymes ou des amylases ajoutées ; cette dernière détermination intégrant tout ensemble, la teneur en enzymes, l'état du substrat et la présence d'effecteurs. On trouvera la description de ces techniques et leur étude critique dans les articles de JONGH (1963), GUILBOT (1964), PERTEN (1968), REED et THORN (1971).

FLEMING, MILLER et JOHNSON (1961) ont même proposé une méthode permettant de distinguer les activités alpha-amylasiques d'origines différentes (malt, fongi, bactéries).

Pour apprécier l'activité protéolytique, on dispose de la méthode d'AYRE-ANDERSON (1939) mesurant la quantité de petites molécules formées à partir d'un substrat protéique standard, la bactohémoglobine. Cependant, PETIT (1972) n'a pu dégager aucune relation de validité générale entre la quantité d'enzyme et la quantité d'azote libéré en fonction de l'origine de la préparation enzymatique. De plus, POMERANZ, RUTENTHALER et FINNEY (1966), KRUGER (1971), BERGER *et al.* (1972) ont pu montrer que les mesures rhéologiques faites sur les pâtes après repos reflétaient beaucoup plus sûrement que la méthode d'AYRE-ANDERSON l'effet de l'activité des préparations de protéases ajoutées, ce qui souligne le rôle essentiel de l'activité endopeptidase de ces enzymes dans les industries de cuisson des céréales.

Dans le cas de la lipoxygénase, NICOLAS, BEAUX et DRAPRON (1972) ont procédé à l'étude critique des diverses méthodes mesurant soit l'oxygène fixé, soit la quantité de peroxydes à doubles liaisons conjuguées formées.

Quelle que soit l'enzyme considérée, il est indispensable de pouvoir établir des corrélations entre son activité en milieu standard, dans des conditions déterminées et l'effet qu'elle peut produire sur les caractéristiques des produits finis. Actuellement, ces relations ont pu être dégagées surtout dans des cas particuliers, pour une technologie donnée. Mais pour aboutir à une véritable généralisation, une connaissance plus précise et plus complète des mécanismes mis en jeu serait nécessaire. Cela suppose en particulier d'étudier :

— l'action de l'enzyme sur le ou les substrats existant dans les produits céréaliers ;
— le comportement de cette enzyme dans ces milieux complexes, en fonction de leur état d'hydratation (GUILBOT, 1967) et des cinétiques thermiques qu'ils subissent ; ces dernières agissant à la fois sur la vitesse propre de la réaction catalysée, sur l'état du substrat et le degré d'inactivation de l'enzyme.

SPÉCIFICATIONS DES CARACTÉRISTIQUES ET DES CONDITIONS D'ADJONCTION DES PRÉPARATIONS COMMERCIALES D'ENZYMES

Les problèmes évoqués se compliquent encore du fait que les préparations commerciales d'enzymes ne sont jamais constituées d'enzymes pures et que leurs caractéristiques varient parfois d'un lot à l'autre, indépendamment des différences qu'elles peuvent présenter selon leur origine (malt, microrganismes).

Les extraits commerciaux ne renferment que rarement un seul type d'activité enzymatique. Il n'est pas inutile de rappeler à ce propos que c'est en utilisant des préparations d'amylase fongique que les Américains ont pu découvrir l'intérêt, en panification, de l'activité protéolytique tant ces soi-disant préparations d'amylase étaient riches en protéases. L'alpha-amylase fongique est, en outre, généralement accompagnée d'une glucamylase. De même, la farine de fèves apporte, avec la lipoxygénase, de nombreuses autres enzymes dont certaines oxydases ou isomérases susceptibles d'être impliquées dans les effets attribués à la seule lipoxygénase.

Il est donc très souhaitable de pouvoir disposer pour l'usage industriel de préparations présentant un taux d'activité normalisé en une enzyme déterminée, avec indication des conditions de conservation, et possédant une sorte de fiche d'identité (caractéristiques de l'enzyme en fonction de son origine et importance des autres activités enzymatiques existant dans la préparation, nature du support et du stabilisant). Si on est souvent encore loin du compte, il n'est pas utopique de penser qu'il sera possible un jour d'employer industriellement des préparations enzymatiques ne présentant qu'un seul type d'activité. Des recherches sont actuellement développées en France sur les protéases et les amylases pour juger de l'intérêt de tels produits (Delecourt, 1972 ; Belloc, Palla et Verrier, 1972).

Sur le plan de l'hygiène et de l'innocuité pour la santé, les préparations d'enzymes à usage alimentaire doivent naturellement être l'objet de spécifications précises et d'un contrôle strict. Cet aspect particulier sera développé par ailleurs.

Généralement, ces préparations commerciales se présentent sous une forme permettant une répartition correcte dans le milieu (farine ou à la rigueur sirop de malt ; extraits en poudre ou en tablettes solubles pour les produits issus de microorganismes). Dans la plupart des pays, la supplémentation en enzymes peut être faite soit au moulin, soit au niveau de l'industrie de cuisson. En France, seules la farine de fèves et la farine de blé malté, sont autorisées en Meunerie, les enzymes extraites de microrganismes ne peuvent être ajoutées qu'au moment du pétrissage. Cette restriction n'est pas sans inconvénient. Le risque d'un dosage défectueux est en effet beaucoup plus grand au niveau d'une profession à structure essentiellement artisanale, avec des moyens de mesure et de contrôle trop souvent rudimentaires et insuffisants. Certes, des préparations enzymatiques telles que celles d'amylase fongique offrent une marge de tolérance assez grande sur la dose utilisée, mais il n'en serait pas de même de l'amylase bactérienne. Il y a tout intérêt, dans l'avenir, à avoir une réglementation permettant l'addition d'enzyme à bon escient et dans les meilleures conditions.

CONCLUSION

Tels sont les principaux aspects et les divers problèmes que présente l'emploi des enzymes dans les industries de cuisson à base de céréales évoluant de plus en plus vers le continu, l'automatisation et la création de produits nouveaux. Il reste encore beaucoup à faire pour maîtriser et optimiser l'action de ces enzymes en technologie des céréales. Cependant, les progrès remarquables accomplis ces dernières années par l'enzymologie et l'industrie des enzymes, la spécificité des effets de ces derniers constituent, à coup sûr, des éléments décisifs pour le développement de leur utilisation.

SUMMARY

USE OF ENZYMES IN CEREAL PRODUCTS BAKING INDUSTRIES

Cereal products baking industries (bread, biscuits, rusks making) get on towards automatization, continuous manufacturing as well as towards obtaining new end products. This evolvement needs particularly to be backed up by a mastery of the raw materials and doughs characteristics, for which the use of enzymes is an important working means.

The properties of the various enzymes presently used — mostly hydrolases and oxydoreductases — are studied as well as their possible effects.

The problems set by optimizating their use are called up.

The influence of raw matters characteristics, of processing, of the type of end products, is emphasized ; so is the necessary of having at one's disposal measurement methods which, when applied to enzymatic activities, could give up results in correlation with the effects one seeks after in practice.

Lastly, the interest is develled on to define precisely the specifications concerning the characteristics of commercial enzymatic preparations and the conditions under which enzymes supplementation takes place.

ZUSAMMENFASSUNG

VERWENDUNG VON ENZYMEN IN DEN BACKINDUSTRIEN DER AUS GETREIDE STAMMENDEN ERZEUGNISSE

Die Backindustrien der aus Getreide stammenden Erzeugnisse (Brotbereitung, Biskuitbäckerei, Zwiebackherstellung) neigen immer mehr zur Automatisierung, zur fortlaufenden Herstellung, sowie zur Erlangung neuer Endprodukte. Dies erfordert insbesondere eine Beherrschung der Rohstoff — und Teigcharakteristiken für die die Verwendung von Enzymen ein wichtiges Wirkungsmittel bildet.

Die Eigenschaften der zur Zeit verwendeten verschiedenen Enzyme, im wesentlichen Hydrolasen und Oxydation-Reduktase , werden untersucht, sowie die Wirkungen, die sie hervorbringen können.

Die Probleme, die für ihre optimale Verwendung auftreten, werden erörtert. Der Einfluss der Eigenschaften der Rohstoffe, des Verarbeitungsverfahrens, des Typus der Endprodukte wird unterstrichen, sowie die Notwendigkeit über Messungstechniken der enzymatischen Activitäten zu verfügen, deren Ergebnisse mit den in der Praxis gesuchten Wirkungen in Wechselbeziehung

stehen. Schliesslich wird mit Nachdruck auf das Interesse hingewiesen, ausreichende und genaue Bezeichnungen der Charakteristiken enzymatischer Zubereitung für den Handel, ihre Bedingungen hinsichtlich Zusatzstoffen gut zu definieren.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anderson J. A., 1946. Enzymes and their role in wheat technology. *Am. Assoc. Cereal Chemists, Monograph series* n° X, Interscience, New York.

Audidier Y., 1966. Cinétiques thermiques internes et cinétiques de pertes pondérales ; leur influence sur l'évolution des phénomènes biologiques dans la pâte. *Conférence du Cycle Cuisson* C. T. U. Éditeur Paris, 3-29.

Audidier Y., 1968. Effets of thermal kinetics and weight loss kinetics on biochemical reactions in dough. *Baker's Dig.*, **42** (5), 36.

Ayre C. A., Anderson J. A., 1939. Varietal differences in barleys and malts. VI. Autolytic proteolytic activity of malt and its correlations with wort nitrogen and barley nitrogen fractions. *Can. J. Research*, **17 C**, 239.

Belloc A., Palla J.-C., Verrier J., 1972. Isolement, purification et propriété de deux amylases et de deux proétases fongiques. Résultats inédits. Action concertée D. G. R. S. T. Paris ; (à paraître dans *Ann. Techn. I. N. R. A.*).

Berger M., Grandvoinnet P., Colas A., Ducroo P., 1972. Test de rhéologie pratique utilisable pour l'appréciation des activités protéolytiques. Résultats inédits. Action concertée D. G. R. S. T. Paris ; (à paraître dans *Ann. Techn. I. N. R. A.*).

Boidin A., Dffront J., 1914. Improvements of methods and apparatus for manufacturing enzymes and toxins. *Brit. Pat.*, **16**, 198.

Bushuk W., Kaminski E., Chua G. K., 1970. Multiple forms of proteases in wheat and wheat malt. *Ve Congrès mondial des Céréales et du Pain*, Dresde, **6**, 115-120.

Bussière G., de la Guerivière J.-F., 1972. Utilisation des alpha-amylases et des glucamylases en panification fine. Résultats inédits. Action concertée D. G. R. S. T. Paris ; (à paraître dans *Ann. Techn. I. N. R. A.*).

Cawley R. W., 1970. Sprouted wheat. Evaluation and utilization. *Ve Congrès mondial des Céréales et du Pain*. Dresde, **6**, 103-106.

Cawley R. W., Mitchell T. A., 1968. Inhibition of wheat alpha-amylase by bran phytic acid. *J. Sci. Foor Agr.*, **19**, 166.

C. N. E. R. N. A., 1968. *Activités enzymatiques et technologie des denrées alimentaires*. C. N. R. S. Paris.

Crozet N., de Pastors A., Petit L., 1971. Modification de structure submicroscopique des protéines du gluten sous l'action de différentes enzymes protéolytiques. *Symposium on « Seed Proteins » de L'American Chemical Society à Los Angeles, 28 mars au 2 avril 1971.*

Danirls N. W., Frazier P. J., Wood P. S., 1971. Flour lipids and dough development. *Baker's Digest*, **4**, 45.

Delecourt R., 1972. Isolement, purification et propriétés d'amylases et de protéases fongiques et bactériennes. Résultats inédits. Action concertée D. G. R. S. T. Paris ; (à paraître dans *Ann. Techn. I. N. R. A.*).

Drapron R., 1916. État actuel de nos connaissances sur l'action des amylases en panification, biscotterie et biscuiterie. *Ind. alim. agr.*, **78**, 273-283.

Drapron R., Beaux Y., 1969. Sur l'oxydation des acides gras essentiels pr la lipoxygénase en panification et la formation de composés volatils intervenant dans l'arôme du pain. *C. R. Acad. Sc.* Paris, **268**, 2598-2601.

Drapron R., Beaux Y., Cormier M., Geffroy J., 1971. Sur l'oxydation enzymatique des tocophérols et des pigments caroténoides au cours de la panification. *C. R. Acad. Agr.*, **57**, 245-251.

Drapron R., Uzzan A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nutr. Alim.*, **22**, 1, 393-436.

Drews E., 1971. Courbes de gonflement des produits de mouture du seigle. *Die Mühle*, **49**, 723-724.

El-Dash A. A., Johnson J. A., 1967. Protease enzymes : effect on bread flavor. *Cereal Sci. Today.*, **12** (7), 282.

Elton G. A. H., 1968. Modern methods of dough making. *C. R. I. C. C.* Vienne.

Fleming J. R., Miller B. S., Johnson J. A., 1961. *Cereal Chem.*, **38**, 479-486.

Gross H., Bell R. L., Fisher F., Redfern S., 1967. IV. Further studies on use of fungal enzymes with flour brews. *Cereal Sci. Today.*, **12** (9), 394.

Guilbot A., 1964. Mises au point de chimie analytique organique, pharmaceutique et bromatologique 12e série. Éd Masson et Cie, Paris, 29-35.

Guilbot A., 1967. Activités enzymatiques en milieu peu hydraté. *Ann. Nutr. Alim.*, **21**, 87-112.

Guilbot A., Drapron R., 1970. Modalités d'action des enzymes dans les milieux pâteux à base de céréales. *Ve Congrès mondial des Céréales et du Pain.* Dresde, **6**, 107-113.

Hildebrand F. C., Burket G. M., 1942. Amylase and protease systems of malted wheat flour. *Cereal Chem.*, **19** 27.

Janicki J., 1970. Anwendung der enzyme bei der getreideverarbeitung. *Ve Congrès mondial des Céréales et du Pain.* Dresde, **6**, 95-102.

Johnson J. A., 1965. Enzymes in wheat technology in retrospect. *Cereal Sci. Today*, **10**, 315.

Jones C. R., 1940. The production of mechanically damaged starch in milling as a governing factor in the diastatic activity of flour. *Cereal Chem.*, **17**, 113.

Jongh G., 1966. Amylase. Determination. Présenté au *IVe Congrès international des Céréales et du Pain* à Vienne.

Kleischmi dt A. W., Higashiuchi K., Anderson R., Ferrari C. G., 1963. Soya lipoxidase as a means of flavor improvement. *Baker's Dig.*, **37** (5), 44-47.

Kruger J. E., 1971. Effects of proteolytic enzymes on gluten as measured by a stretching effect. *Cereal Chem.*, **48** (2), 121-132.

Maes E., 1967. Une machine automatique pour la fabrication continue du pain. *Ind. alim. agr.*, **84** (2), 139-142.

Maes E., Van den Driessche S., Bernaerts M., 1955. The microbial origin of proteolytic enzymes in flour. *Chem. Abs.*, **49**, 4195 *e*.

Mercier Ch., Colas A., 1967. Les amylases en panification. *Ann. Nutr. Alim.*, **21**, 299-340.

Miller B. S., Johnson J. A., 1948. High levels of alpha-amylase in baking. II. Proteolyse in straight and sponge doughs. *Cereal Chem.*, **25**, 178-190.

Miller B. S., Johnson J. A., Palmer D. L., 1953. A comparison of cereal fungal and bacterial alpha-amylases as supplements for bread making. *Food Technol*, **7**, 38.

Mounfield J. D., 1936. The proteolytic enzymes of sprouted wheat. II. *Biochem. J.*, **30**, 1778.

Nicolas J., Beaux Y., Drapron R., 1972. Les méthodes de mesure de l'activité lipoxygénasique. Résultats inédits. Action concertée D. G. R. S. T. Paris ; (à paraître dans *Ann. Techn. I. N. R. A.*).

Palla J.-C., Verrier J., 1972. Inhibition de l'alpha-amylase de blé par l'acide ascorbique et par des dérivés de l'isoalloxagine. Résultats inédits. Action concertée D. G, R. S. T. Paris ; (à paraître dans *Ann. Techn. I. N. R. A.*).

Payen A., Persoz J., 1833. Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels. *Ann. Chim. Phys.*, **53**, 73.

Perten H., 1968. Methods for determining alpha-amylase activity in cereal grains and flour. *Cereal Sci. Today*, **13**, 192.

Petit L., 1972. Étude critique des méthodes chimiques de dosage des activités protéolytiques. Résultats inédits. Action concertée D. G. R. S. T. Paris ; (à paraître dans *Ann. Techn. I. N. R. A.*).

Petit L., Audidier Y., 1967. Action des protéinases dans les industries de cuisson. *Ann. Nutr. Alim.*, **21**, 6, 341-360.

Polyak M. V., Linetskaya G. N., 1968. *Fermenty Med., Pishch. Prom. Sel. Khoz.*, 155-157 (russe) in *Chem. Abstr.*, **71**, 226 (1969).

Pomeranz Y., Rubenthaler G. I., Finney K. F., 1966. Evaluation of the effects of proteolytic enzymes on bread flour properties. *Food Technol.*, **20** (3), 95.

Pyler E. J., 1969. Enzymes in baking. Theory and practice. *The Baker's Digest*, February, 36-47, april, 46-52.

Reed G., 1966. *Enzymes in food processing.* Acad. Press New York et Londres, 221-254.

Reed G., Thorn J. A., 1971. *Enzymes in wheat chemistry and technology.* 2e édition, vol. **3**, Pomeranz Edit., A. A. C. C. Monograph series U. S. A.

Roitier I. M., Berzina N. I., 1963. Action of sodium chloride on the activity of wheat proteases flour suspensions. *Izv Vysshilkh Vchebn. Zavedenii, Pishchevaya Teckhgnol.* N° 6, 40-45.

Shellenberger J. A., 1970. The historical development of the application of fungal and bacterial enzymes to the baking industry. *C. R. du Ve Congrès mondial des Céréales et du Pain.* Dresde, **6**, 89-93.

Silberstein O., 1964. Heat-stable bacterial alpha-amylase in baking. Application to while bread. *Baker's Dig.*, **38** (4), 66.

Waldt L. M., 1965. Fungal enzymes : their role in continuous process bread. *Cereal Sci. Today*, **10**, 8, 447.

Weith L., 1963. Zur wirkung von amylase haltigen mehlverbesserungmitteln. *Brot Gebaeck*, **17**, 21-26.

Whelan W. J., Gunja-Smith Z., Marshall J. J., Mercier C., Smith E. E., Wober G., 1971. Starch debranching enzymes. Communication présentée au *56th Annual Meeting of A. A. C. C*, Dallas U. S. A.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 253-266.

UTILISATION D'AMYLASES EN PANIFICATION FINE ET DE PROTÉASES EN BISCUITERIE SÈCHE

J.-F. de la GUÉRIVIÈRE

Centre technique des Unions,
1, rue Montgolfier,
75 - Paris 3e

RÉSUMÉ

Dans le domaine de la biscotterie, l'incorporation de glucamylase se révèle techniquement intéressante car cette enzyme, en catalysant la transformation directe de l'amidon en glucose, favorise l'activité fermentaire de la levure et permet la réduction des temps de dernière fermentation. Les produits finis obtenus présentent d'excellentes caractéristiques organoleptiques et, notamment, ceux subissant un grillage, puisque la réaction de Maillard est accentuée.

Les alpha-amylases bactériennes introduites à très faibles doses, freinent la vitesse de raffermissement de la mie des pains au cours du temps.

En biscuiterie sèche, l'adjonction de protéases diminue ou même supprime les effets engendrés par le phénomène de rétraction des pâtes : de la sorte, le technologue peut maîtriser les caractéristiques dimensionnelles des biscuits qu'il fabrique. En outre, ces articles présentent des densités faibles et une très bonne friabilité. Enfin, l'industriel biscuitier, utilisateur d'enzymes protéolytiques, dispose d'un moyen efficace pour lutter contre les conséquences néfastes d'une teneur protéique excessive de certaines farines qu'il peut être amené à mettre en œuvre.

INTRODUCTION

Choisir la nature des enzymes pouvant être utilisées dans les industries de cuisson des céréales revient à bien définir les caractéristiques fondamentales qui différencient les buts technologiques recherchés d'une part en biscotterie et d'autre part en biscuiterie.

En panification fine, comme en boulangerie, le but du pétrissage est de constituer un réseau glutineux en communiquant une énergie appropriée à une pâte fortement hydratée obtenue à partir d'une farine d'une teneur protéique suffisante.

Pour la fabrication de la biscotte, le réseau protéique observable en fin de pétrissage est continu et homogène et le produit fini possède en conséquence un alvéolage

fin et régulier. Ce réseau est également continu mais cette fois hétérogène pour que le pain français ou le pain grillé présente un alvéolage grossier et irrégulier.

Dans les deux cas, le technologue recherche une forte rétention gazeuse de la pâte pour la bonne conduite de la fermentation, tout en évitant que le réseau protéique formé soit trop résistant, c'est-à-dire nuise à l'action mécanique de la poussée des gaz et soit la cause d'un développement moindre des pains.

Si en panification, l'homme d'usine fabrique un produit dont l'armature présente un certain degré de rigidité, le biscuitier, par contre, commercialise des articles friables. Or, la formation d'un réseau glutineux entraîne toujours une perte de friabilité et un durcissement marqué du produit fini. On conçoit dès lors que le pétrissage en biscuiterie sèche ne consiste qu'en un mélange des ingrédients mis en présence pour réaliser une masse qui soit la plus homogène possible. Les farines sont choisies à dessein pauvres en protéines, les hydratations des pâtes sont réduites au minimum et, sucres, comme matières grasses, sont ajoutés en quantités notables. De la sorte, l'industriel s'efforce de limiter l'hydratation et le gonflement des protéines et de minimiser les contacts entre les particules protéiques.

De ce rappel découle certaines évidences :

En panification, mises à part certaines fabrications d'articles à haute teneur protéique (pains au gluten par exemple), l'emploi de protéases va à l'encontre des objectifs poursuivis et l'incorporation d'amylases ne se justifie que si ces enzymes exercent un effet bénéfique sur certaines phases de la fabrication et/ou au cours du vieillissement des produits finis.

En biscuiterie, la mise en œuvre de protéases doit permettre d'améliorer les caractéristiques organoleptiques de certains articles et l'utilisation d'amylases, d'ajuster le niveau enzymatique de farines hypodiastasiques.

Les résultats qui vont être brièvement énumérés ci-dessous ont été obtenus au Centre Technique des Unions dans le cadre d'une action concertée intitulée : « Utilisation d'enzymes dans les industries de cuisson des céréales » et réalisée sous l'égide et avec l'aide financière de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (D. G. R. S. T.).

RÉSULTATS

1. *Dans le domaine de la panification fine*, les effets de l'adjonction de glucamylases et d'alpha-amylases ont été particulièrement étudiés.

On rappelle que la glucamylase ou amyloglucosidase, ou gluco-amylase ou gamma-amylase ou encore $\alpha(1 - 4)$ glucane glucohydrolase hydrolyse les liaisons alpha 1 — 4 et alpha 1 — 6 des constituants de l'amidon en libérant directement du glucose.

Cette enzyme obtenue à partir d'*Aspergillus niger* est d'origine fongique.

L'alpha amylase ou alpha 1 — 4 glucane 4 glucanohydrolase hydrolyse au hasard les liaisons alpha 1 — 4 des chaînes d'amylose et d'amylopectine à l'exclusion des liaisons terminales. La préparation commerciale utilisée dans le cadre de ces essais est d'origine bactérienne (*Bacillus subtilis*) et d'une activité égale à 2 500 unités S. K. B. par gramme.

L'action de ces deux types d'amylases sur les pâtes de panification est bien résumée tant au cours du pétrissage par les résultats obtenus au farinographe Brabender qu'à la fermentation par ceux du zymotachygraphe Chopin.

Le farinographe Brabender est un pétrin qui enregistre la consistance des pâtes au cours du pétrissage. Les valeurs de consistance sont données en unités définies par le constructeur. La figure 1 montre que l'incorporation de 1 p. 100 de gluca-

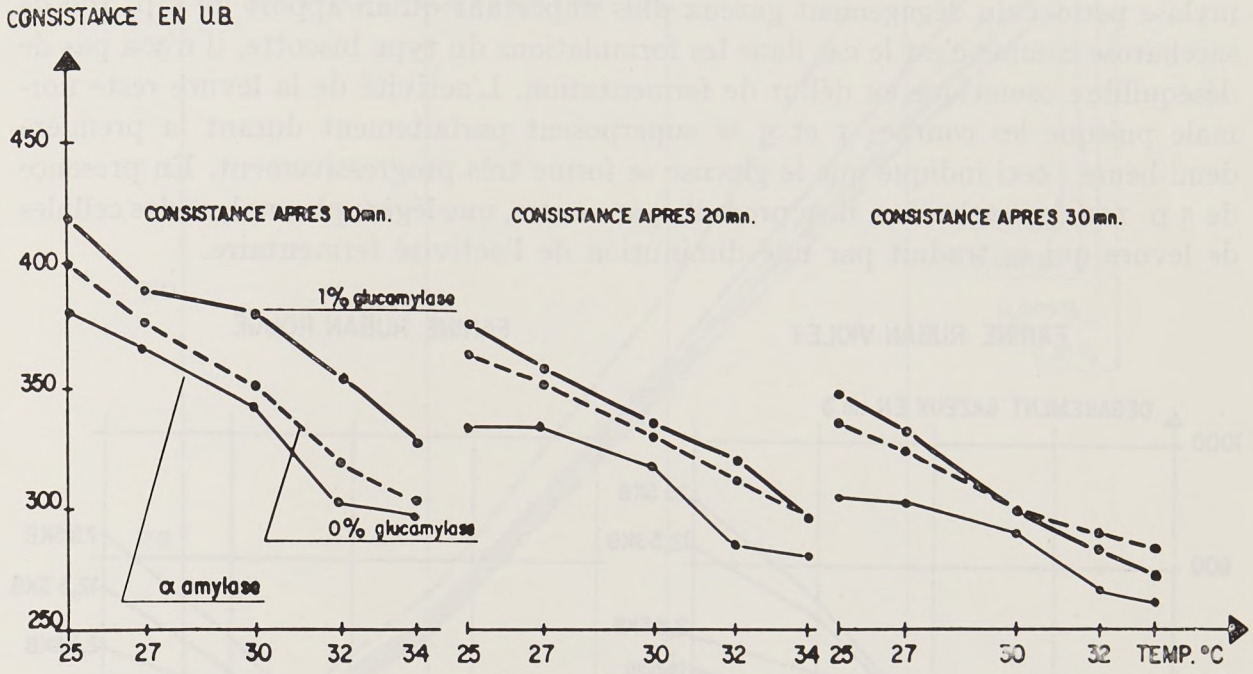


FIG. 1. — *Farinogrammes.*

mylase exprimé par rapport à la farine mise en œuvre augmente sensiblement la consistance des pâtes, tandis qu'une dose de 2,5 S. K. B. d'alpha amylase pour 100 grammes de farine telle quelle la diminue par rapport à l'essai témoin. L'action liquéfiante qu'exercent les alpha-mylases sur les pâtes est mise en évidence. Elle se traduit en fabrication par l'obtention de pâtes collantes difficilement « machinables », notamment au stade du laminage. La formation de glucose catalysée par le glucamylase entraîne un effet inverse puisque les pâtes en contenant sont plus fermes que l'essai témoin. L'adjonction de cette enzyme ne présente donc pas d'inconvénient en fabrication.

Le zymotachygraphe Chopin enregistre quant à lui le dégagement gazeux produit par la levure au sein de la pâte.

Dans le cas d'une pâte complète du type biscotte renfermant 5 p. 100 de sucre, le dégagement gazeux augmente avec la dose d'alpha amylase ajoutée. Cette influence se fait surtout sentir durant les 3e et 4e heures de fermentation (fig. 2), le maltose formé en est responsable. Or, en panification fine, les temps de fermentation sont courts et le gain enregistré ne pourrait être que modeste. De plus, au-delà d'une dose de 10 S. K. B., il apparaît que quelle que soit la farine utilisée, la pâte devient poreuse dès la première heure de fermentation, fait qui n'est jamais observé dans le cas des essais témoins. Cette porosité s'accentue considérablement à la 2e heure.

Si l'on introduit dans une formule à 2 p. 100 de saccharose différents pourcentages de glucamylase, on observe que le dégagement gazeux augmente avec la dose

incorporée : le glucose formé est directement assimilable par la levure (fig. 3). L'importance de ce dégagement augmente avec le temps puisque si pour 1 p. 100 de glucamylase l'augmentation du volume gazeux est de 24 p. 100 par rapport au témoin durant la 1re heure, elle est de 62 p. 100 au cours de la 4e heure. En outre, l'action de la glucamylase n'affecte pas la porosité de la pâte : le volume du gaz total retenu par la pâte témoin est égal à celui emprisonné par les pâtes supplémentées en glucamylase. On remarque sur la figure 4 qu'outre le fait que l'apport d'1 p. 100 de glucamylase permet un dégagement gazeux plus important qu'un apport de 5 p. 100 de saccharose comme c'est le cas dans les formulations du type biscotte, il n'y a pas de déséquilibre osmotique en début de fermentation. L'activité de la levure reste normale puisque les courbes 1 et 3 se superposent parfaitement durant la première demi-heure : ceci indique que le glucose se forme très progressivement. En présence de 5 p. 100 de saccharose, il se produit, par contre, une légère plasmolyse des cellules de levure qui se traduit par une diminution de l'activité fermentaire.

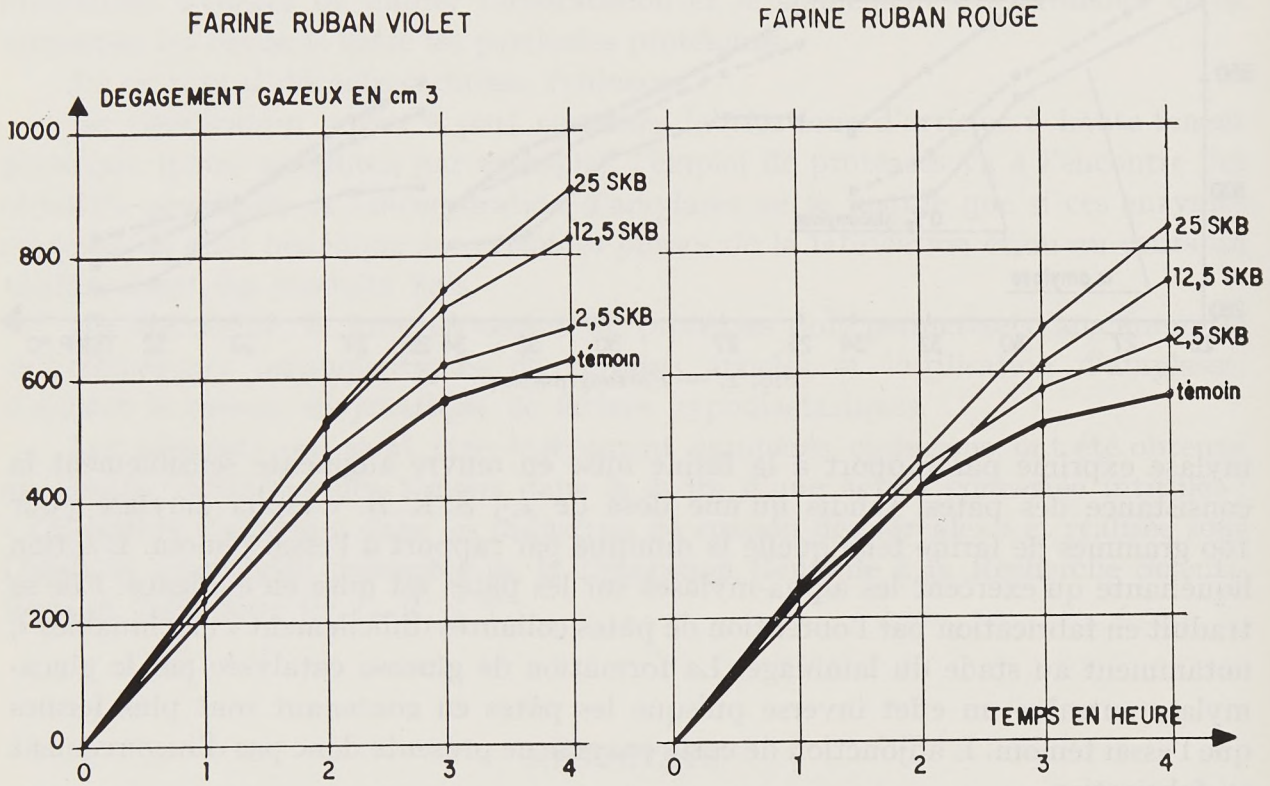


Fig. 2. — *Dégagement total au zymotachygraphe en fonction de la concentration α-amylase*

Bien entendu, les essais de fabrication ont confirmé les résultats de ces tests. Les temps de dernière fermentation sont considérablement raccourcis en présence de glucamylase, puisque 1 p. 100 de glucamylase les peut réduire de près de 50 p. 100 pour obtenir un volume de pain analogue à celui de l'essai témoin. Une dose optimale a pu être définie : 0,05 p. 100 ; les tranches des pains de mie ou des pains biscottes présentent des alvéoles fins, la mie est souple et soyeuse et les qualités gustatives sont améliorées par l'apparition d'un goût brioché. Au grillage, dans le cas des produits déshydratés, la coloration est plus intense car la réaction de Maillard est accentuée. Il reste bien entendu à savoir si la mise en œuvre de telles enzymes sera autorisée et si son prix lui permettra une large utilisation industrielle.

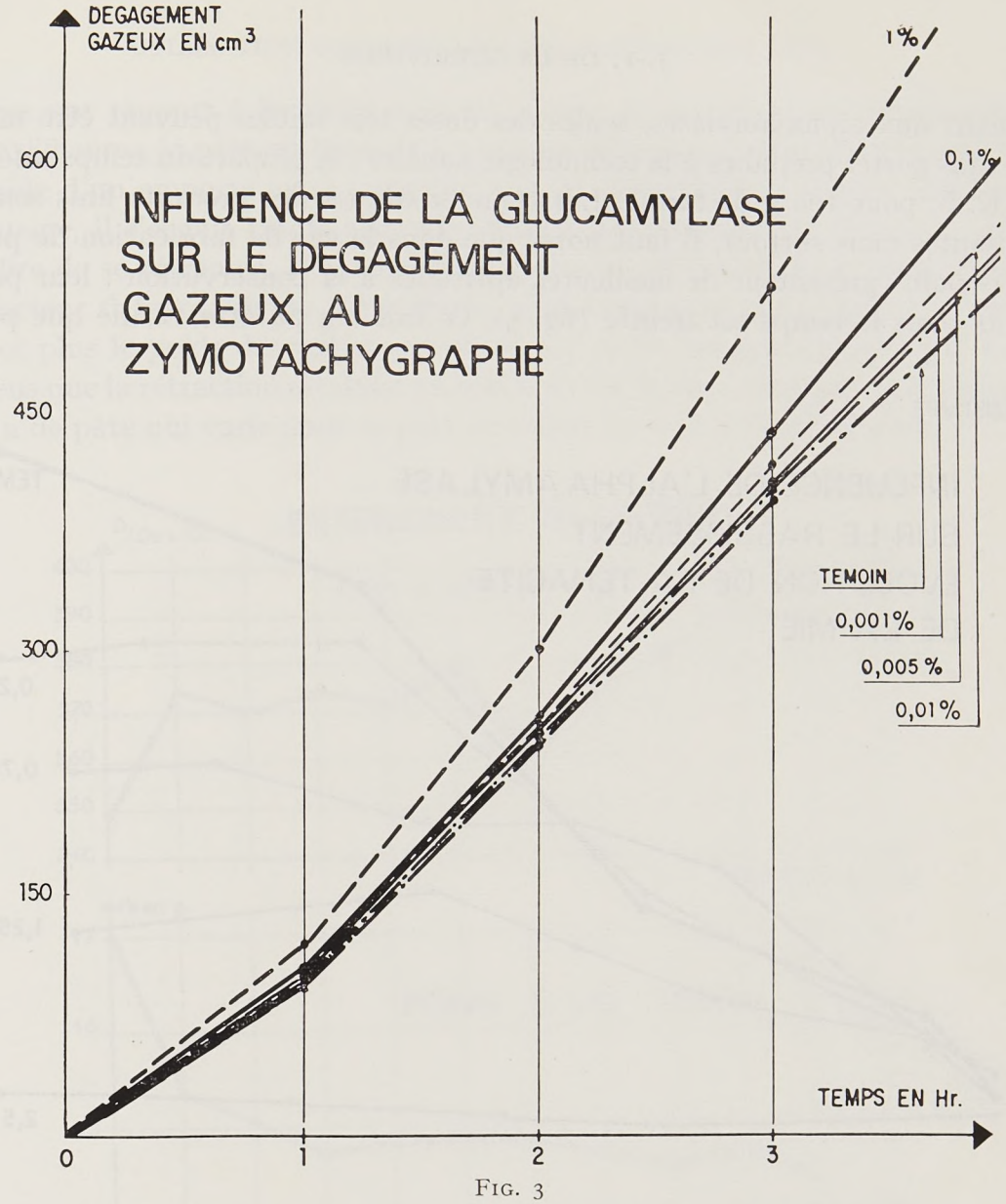

DEGAGEMENT
GAZEUX EN cm3
INFLUENCE DE LA GLUCAMYLASE
SUR LE DEGAGEMENT
GAZEUX AU
ZYMOTACHYGRAPHE
1%
0,1%
TEMOIN
0,001%
0,005 %
0,01%
600
450
300
150
0
1
2
3
TEMPS EN Hr.

FIG. 3

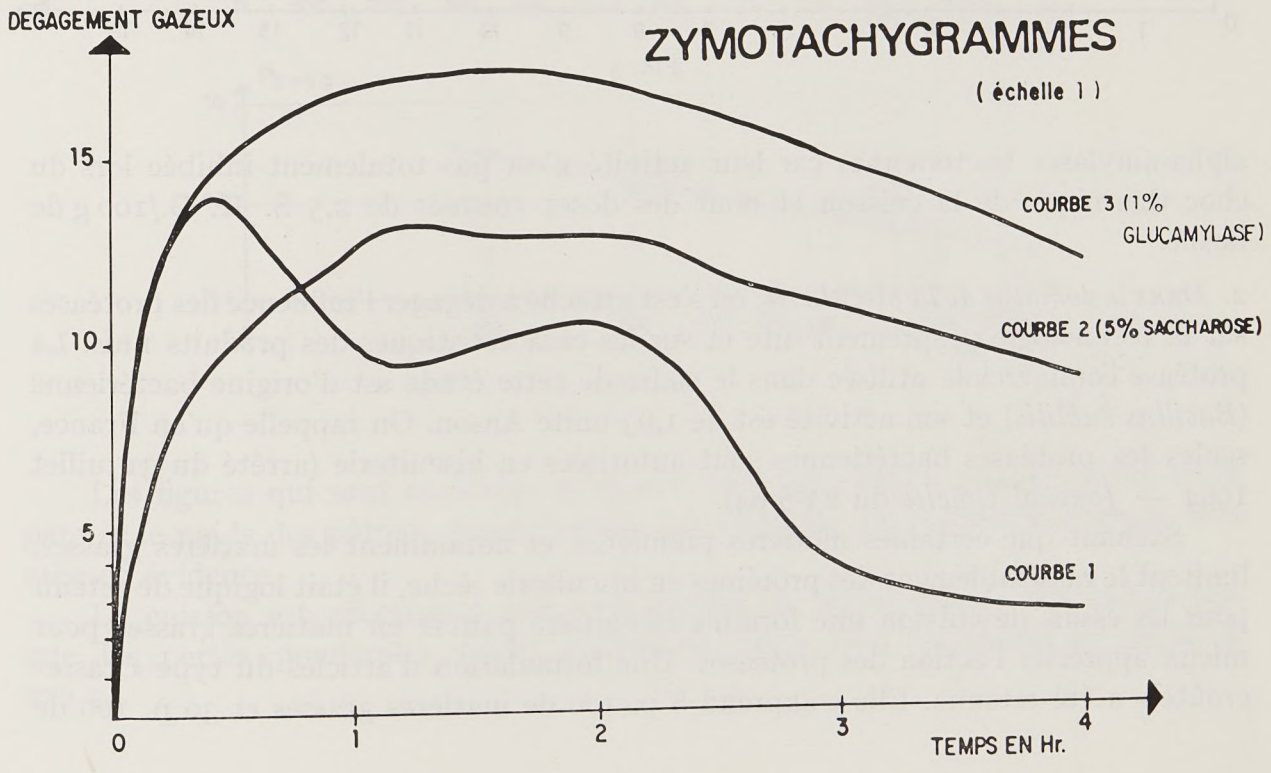

DEGAGEMENT GAZEUX
ZYMOTACHYGRAMMES
(échelle 1)
COURBE 3 (1%
GLUCAMYLASE)
COURBE 2 (5% SACCHAROSE)
COURBE 1
15
10
5
0
1
2
3
4
TEMPS EN Hr.

FIG. 4

Quant aux alpha-amylases, seules des doses très faibles peuvent être mises en œuvre sans porter préjudice à la technologie panaire : la plupart du temps inférieures à 3 S. K. B. pour 100 g de farine. Les caractéristiques des produits finis sont alors satisfaisantes mais surtout, il faut noter que dans le cas de fabrication de produits frais, les pains présentent de meilleures aptitudes à la conservation : leur perte de moelleux dans le temps est freinée (fig. 5). Ce fait n'a pu être vérifié que pour les

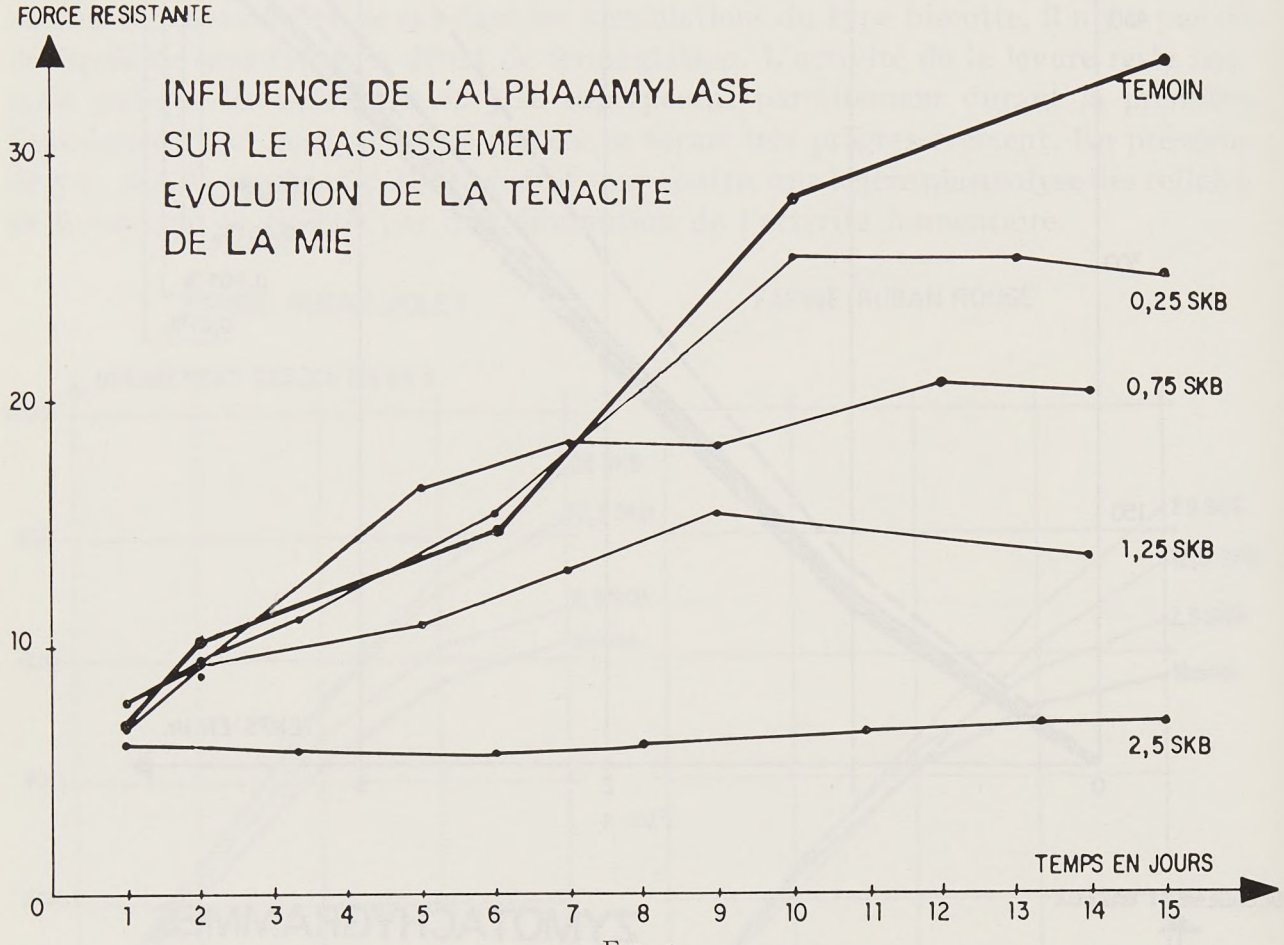


FIG. 5

alpha-amylases bactériennes car leur activité n'est pas totalement inhibée lors du choc thermique de la cuisson et pour des doses voisines de 2,5 S. K. B./100 g de farine.

2. *Dans le domaine de la biscuiterie,* on s'est attaché à dégager l'influence des protéases sur la technologie proprement dite et sur les caractéristiques des produits finis. La protéase commerciale utilisée dans le cadre de cette étude est d'origine bactérienne (*Bacillus subtilis*) et son activité est de 1,63 unité Anson. On rappelle qu'en France, seules les protéases bactériennes sont autorisées en biscuiterie (arrêté du 31 juillet 1964 — *Journal Officiel* du 25-8-64).

Sachant que certaines matières premières, et notamment les matières grasses, limitent le rassemblement des protéines en biscuiterie sèche, il était logique de retenir pour les essais de cuisson une formule biscuitière pauvre en matières grasses pour mieux apprécier l'action des protéases. Une formulation d'articles du type « casse croûte » a été retenue. Elle comprend 8 p. 100 de matières grasses et 30 p. 100 de

saccharose par rapport à la farine mise en œuvre. Après pétrissage et un temps de repos de 18 heures, la pâte est laminée à 2,15 mm d'épaisseur et les pâtons sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce carré de 6 cm de côté. Entre le dernier laminage et le découpage, il s'écoule trente secondes, temps qui permet à la pâte de se relaxer, c'est-à-dire de se rétracter. Il en résulte que plus la rétraction de la pâte est importante (facteur défavorable en fabrication), plus l'épaisseur de la bande de pâte est grande et plus le poids des pâtons est élevé. Le poids des pâtons qui varie dans le même sens que la rétraction est donc un indice de rétraction, de même que la longueur du ruban de pâte qui varie pour sa part en raison inverse de la rétraction.

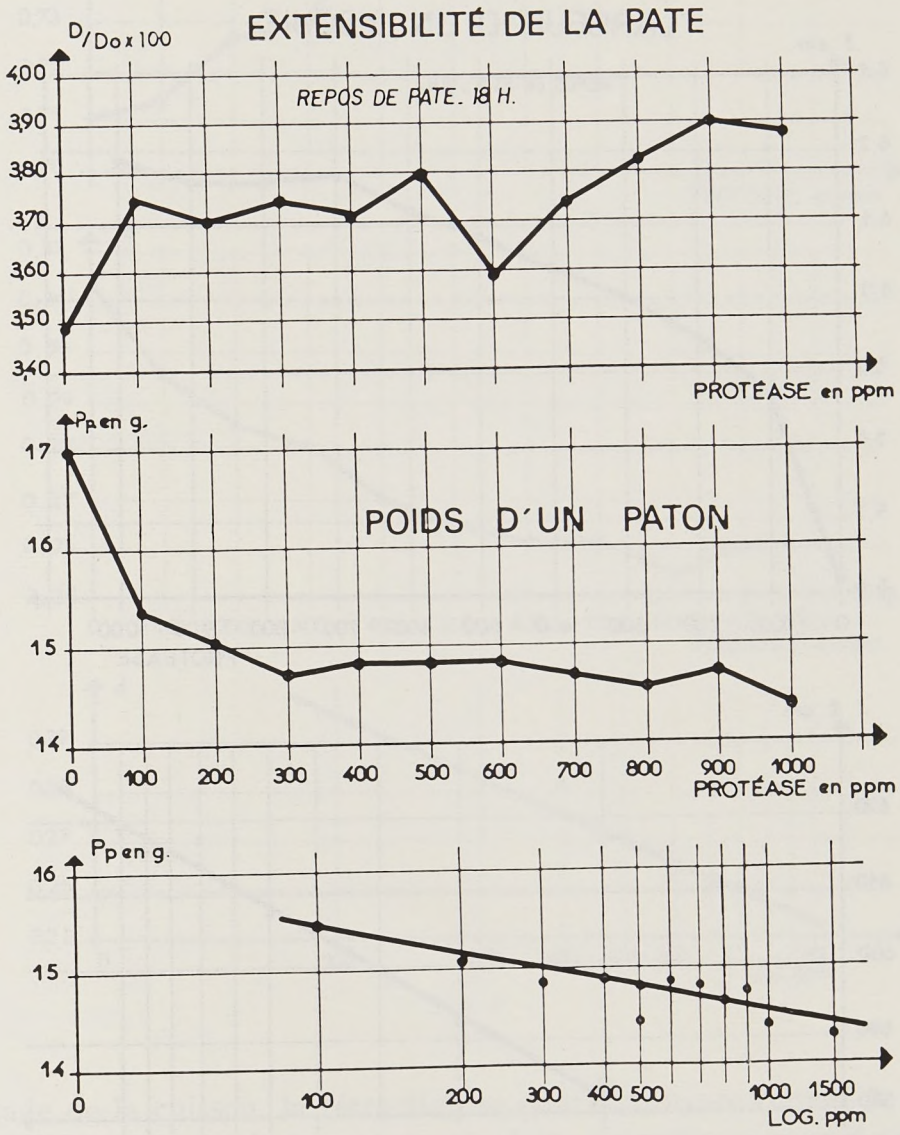


Fig. 6

Les figures qui sont montrées indiquent donc les valeurs d'extensibilité de la pâte et le poids des pâtons. Ainsi l'action des protéases sur les pâtes peut-elle être mise en évidence.

La cuisson est effectuée à une température de 280°C durant des temps tels que les pertes pondérales soient constantes dans tous les essais et égales à 220 g.

Les critères suivants sont évalués sur le produit fini :

— largeur d'un biscuit, c'est-à-dire le côté de l'article subissant la plus forte rétraction au cours de la cuisson ;

— la hauteur corrigée du biscuit, qui exprime le développement de l'article ramené à 1 g de pâte ;

— le densité des biscuits ;

— les caractéristiques organoleptiques ; un jury de dégustation note l'aspect extérieur de l'article : sa couleur, son état de surface, sa friabilité et sa flaveur. Ces résultats sont complétés par des mesures objectives de dureté par pénétrométrie.

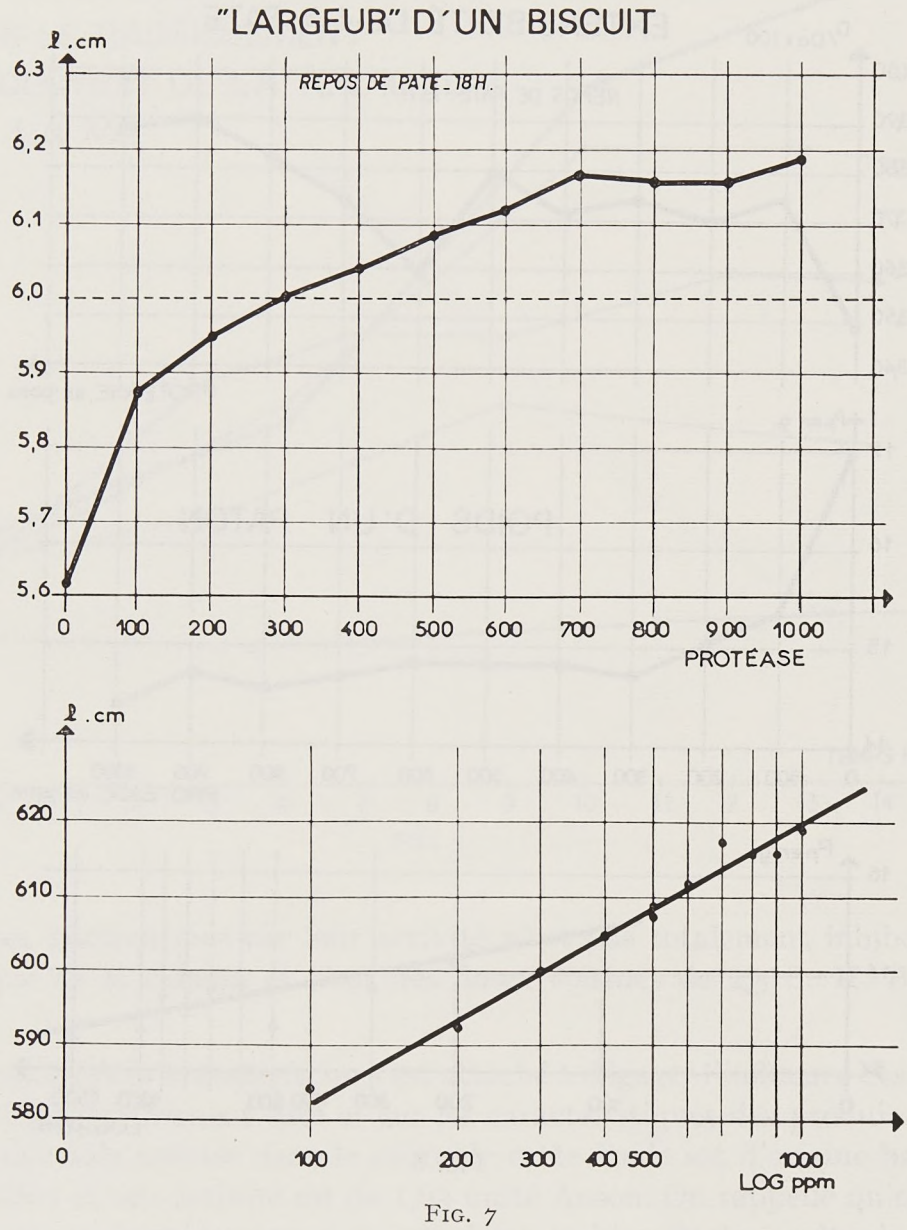


Fig. 7

Il a été tout d'abord étudié l'influence de la concentration en protéases : 100 à 1 500 p.p.m.

On constate (fig. 6) que l'extensibilité de la pâte est minimum pour l'essai témoin, ce qui équivaut à une rétraction élevée. L'apport de protéases diminue fortement cette rétraction dès 100 p.p.m. De même les pâtons de l'essai témoin sont les plus

lourds, et 300 p.p.m. de protéases réduisent ces poids de 12 p. 100, cette dose paraît d'ailleurs suffisante. L'évolution de la rétractabilité est de type logarithmique comme le montre la représentation. Une loi classique en enzymologie est retrouvée : l'activité d'une enzyme est proportionnelle au logarithme de sa concentration.

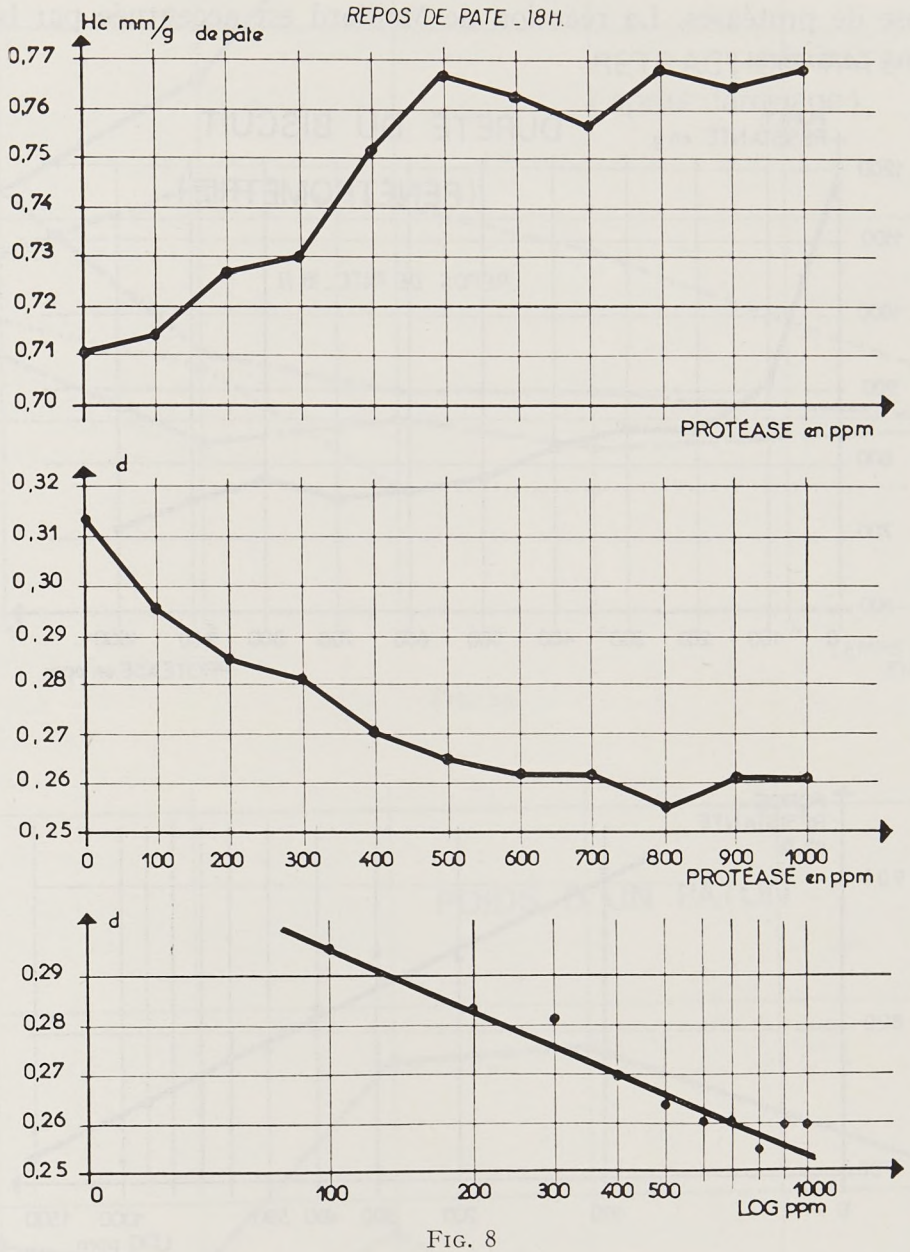


FIG. 8

Au stade de la cuisson, la rétraction se poursuit encore durant le début de la cuisson et elle s'oppose à l'étalement des produits, lui-même engendré par leur diminution de consistance à une température proche de 60°C (fig. 7). La rétraction est maximum avec le témoin (6,3 p. 100) et une dose de 300 p.p.m. suffit à rendre la rétraction égale à l'étalement et à conférer au produit fini les dimensions exactes de celles imprimées par l'emporte-pièce, c'est-à-dire 6 cm. Le gain d'étalement est alors de 10 p. 100 par rapport au témoin. Le développement ou hauteur corrigée (fig. 8) augmente sensiblement jusqu'à 500 p.p.m. puis se stabilise pour des doses supérieures de protéases. La densité diminue avec l'apport de protéases (chute de 17,5 p. 100

avec 600 p.p.m.). La dureté (fig. 9) appréciée par la mesure de la force résistance opposée par le biscuit à la pénétration d'un cône d'ouverture de 15° est maximum avec l'essai témoin. Le jury de dégustation accorde sa note maximum : 6,8/10 aux articles fabriqués avec une dose de 300 p.p.m. contre 4,5 au témoin. Il note que l'état de surface des biscuits est parfait pour cette dose et que la coloration croît avec la dose de protéases. La réaction de Maillard est accentuée par la libération de fonctions aminées.

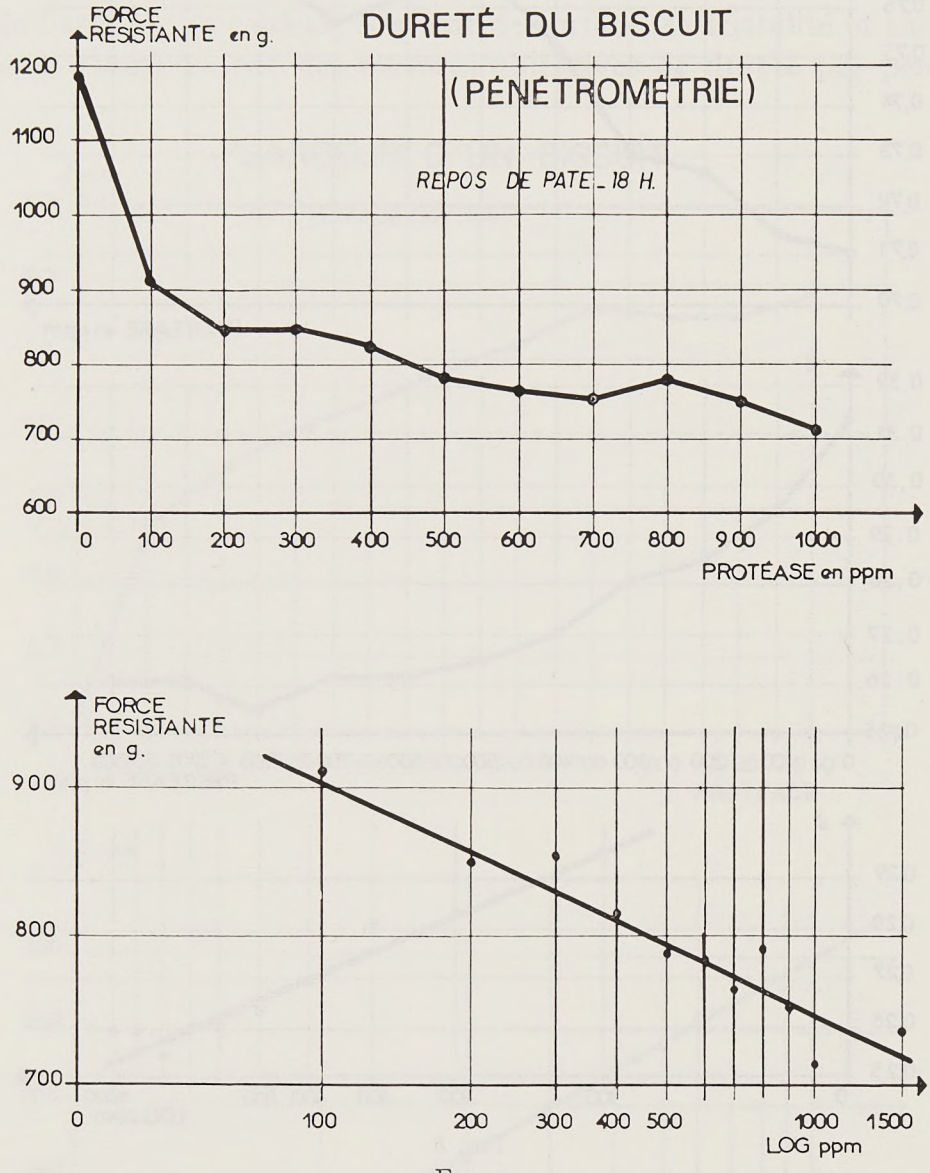


FIG. 9

Ainsi l'apport de protéases en une telle fabrication biscuitière se révèle singulièrement efficace : diminution voire suppression des effets néfastes de la rétraction des pâtes — amélioration très sensible des caractéristiques finales de l'article liée à un intérêt économique évident puisque la densité des produits finis chute de façon importante sans fragiliser à l'excès ces articles pourvu que la dose de protéases soit correctement ajustée. Enfin, il est à souligner qu'en dépit du milieu complexe au sein duquel agissent ces enzymes, leur influence s'exerce suivant une loi logarithmique. Ceci revient à dire que leur activité à faibles doses est proportionnellement supérieure à celle relevée pour des doses plus fortes.

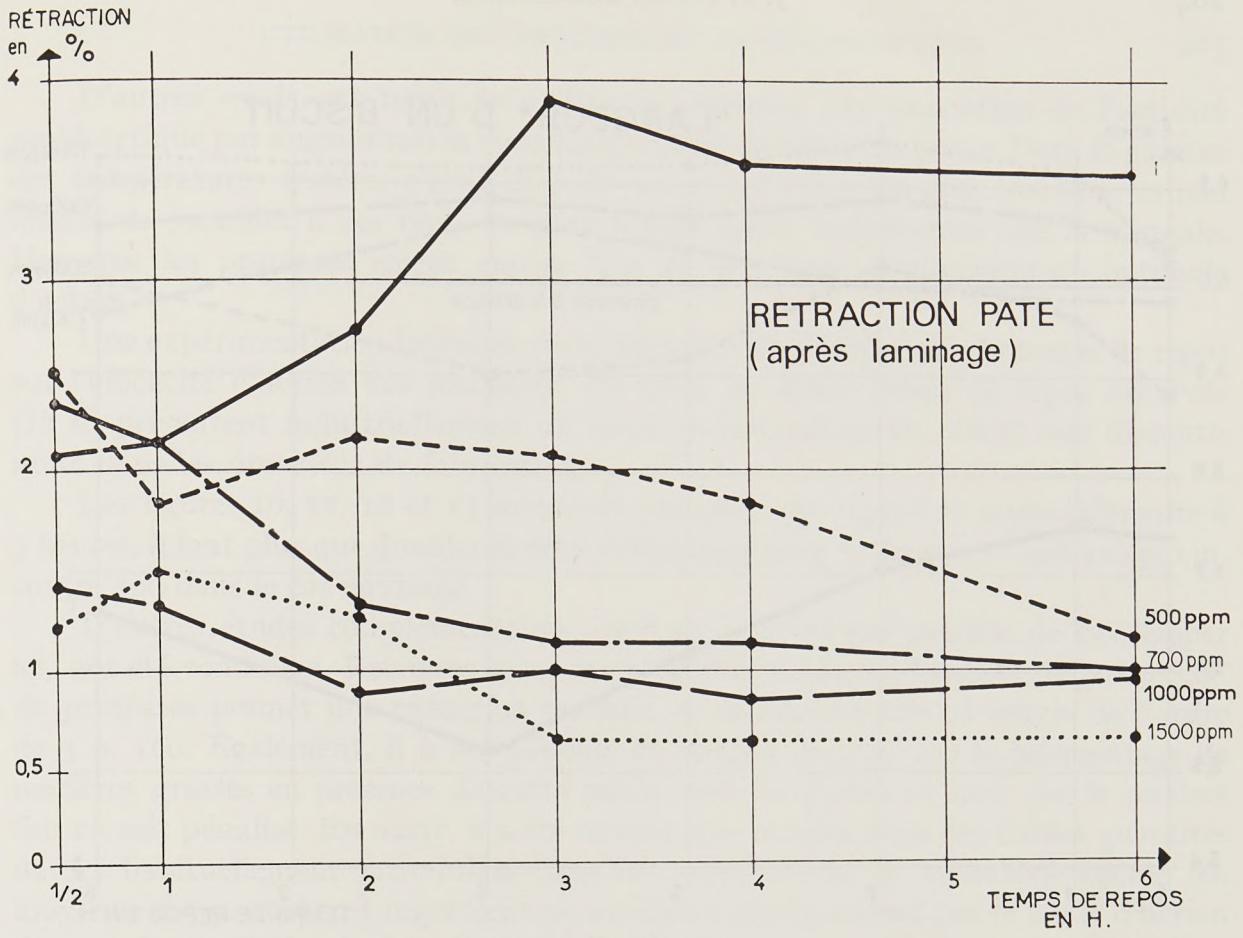

RÉTRACTION
en %
4
3
2
1
0,5
0
RETRACTION PATE
(après laminage)
500 ppm
700 ppm
1000ppm
1500ppm
1/2
1
2
3
4
5
6
TEMPS DE REPOS
EN H.

FIG. 10

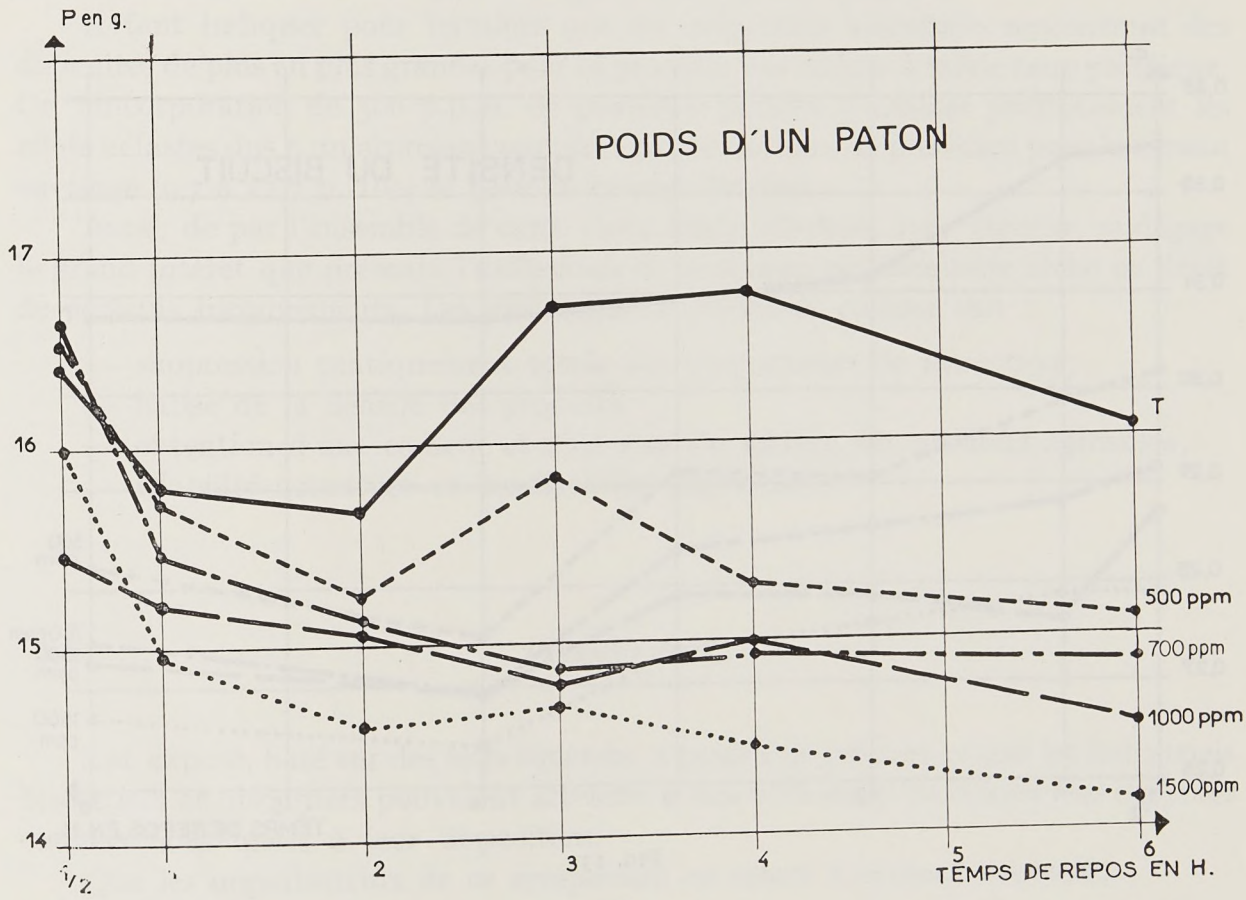

P en g.
POIDS D'UN PATON
17
16
15
14
T
500 ppm
700 ppm
1000 ppm
1500ppm
2
3
4
5
6
TEMPS DE REPOS EN H.

FIG. 11

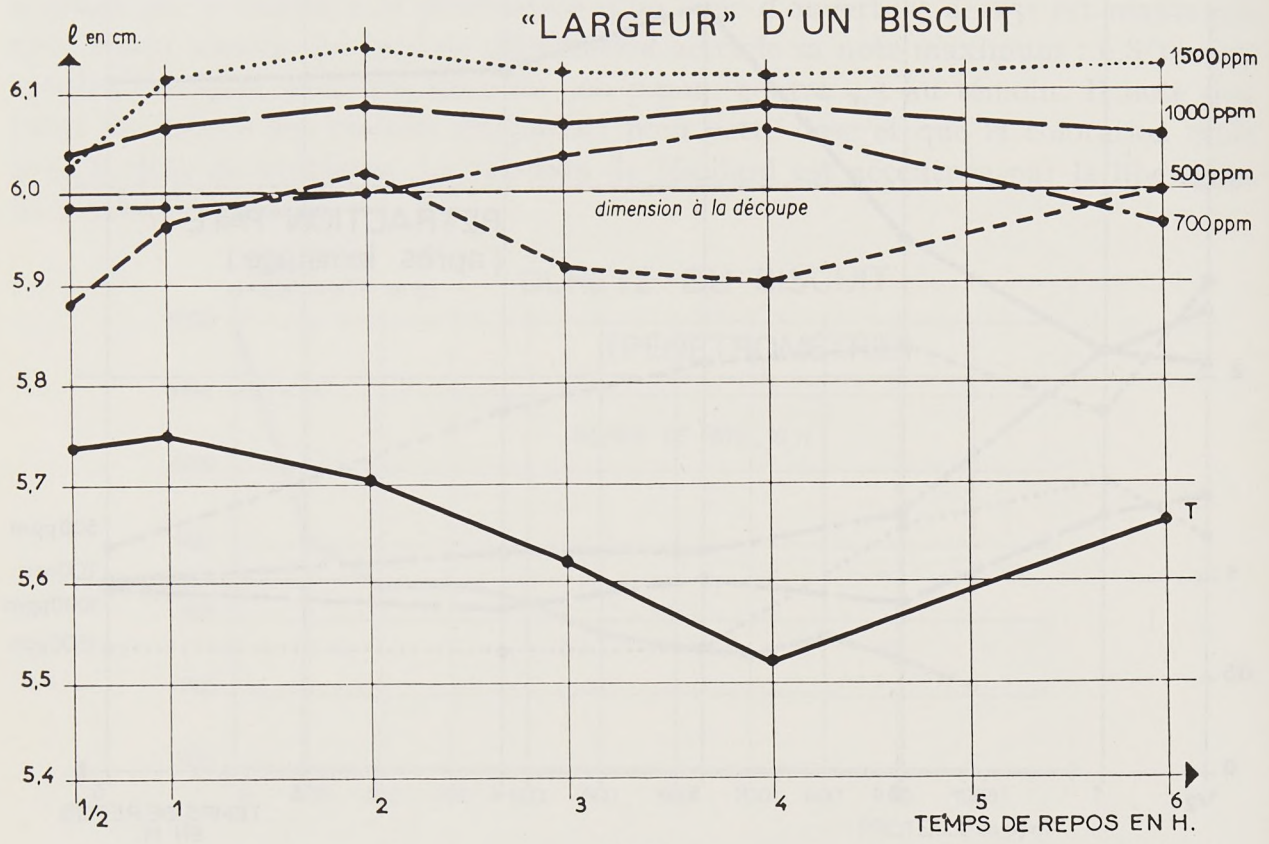

"LARGEUR" D'UN BISCUIT
ℓ en cm.
6,1
6,0
5,9
5,8
5,7
5,6
5,5
5,4
1500ppm
1000ppm
500ppm
700ppm
dimension à la découpe
T
1/2
1
2
3
4
5
6
TEMPS DE REPOS EN H.

FIG. 12

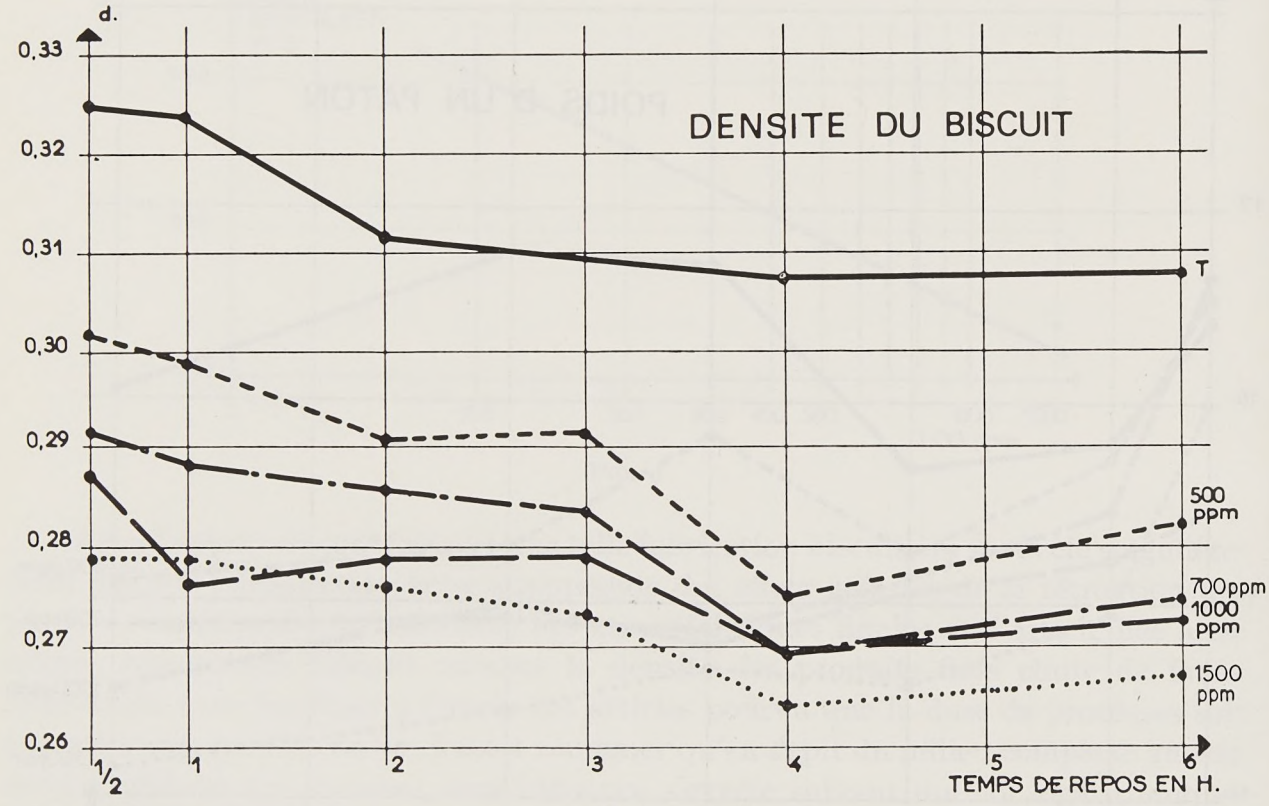

d.
0,33
0,32
0,31
0,30
0,29
0,28
0,27
0,26
DENSITE DU BISCUIT
T
500 ppm
700ppm
1000 ppm
1500 ppm
1/2
1
2
3
4
5
6
TEMPS DE REPOS EN H.

FIG. 13

D'autres essais ont tenté de mettre en évidence une exaltation de l'activité protéolytique par augmentation de la température de repos des pâtes. Dans la gamme des températures testées, c'est-à-dire de 20 à 33°C, il a pu être conclu à un réel intérêt de procéder à des repos de pâte à plus haute température que la normale, bien que les protéases soient encore loin de leur zone de température optimale d'action.

Une expérimentation intéressante consistait à voir l'influence du temps de repos sur l'efficacité d'action des protéases. En effet, les longs temps de repos observés (18 h) présentent industriellement un inconvénient puisqu'ils créent une discontinuité dans les processus de fabrication.

Les figures 10, 11, 12 et 13 montrent que pour des temps de repos inférieurs à 3 heures, il faut plus que doubler la dose déterminée pour 18 heures — soit 700 p.p.m. contre 300 dans le cas envisagé.

D'autres études complémentaires, qu'il ne nous est pas possible de développer ici, ont été conduites. Retenons que pour 18 heures de repos, l'apport de 300 p.p.m. de protéases permet une réduction du taux de saccharose mis en œuvre de l'ordre de 5 p. 100. Également, il a été possible de réduire de 2 p. 100 le pourcentage de matières grasses en présence de cette même dose de protéases sans que le produit fini en soit pénalisé. En outre, il a été montré que compte tenu des faibles quantités de sel habituellement introduites dans les formulations de biscuiterie sucrée (en moyenne 1,5 p. 100), cet ingrédient ne modifiait pratiquement pas le mode d'action des protéases. Enfin, le fait d'augmenter l'hydratation de la formule permet d'accroître faiblement l'activité protéolytique des enzymes ajoutées.

Il faut indiquer pour terminer que les industriels biscuitiers rencontrent des difficultés de plus en plus grandes pour se procurer des farines à faible taux protéique. Or, l'incorporation de 300 p.p.m. de protéases permet d'annuler pratiquement les effets néfastes dus à un accroissement de 2 p. 100 du taux de protéines pour le niveau envisagé (9,7 à 11,7 p. 100) et pour la formule étudiée.

Ainsi, de par l'ensemble de cette vaste étude effectuée avec vigueur, se dégage le grand intérêt que présente l'utilisation de protéases en biscuiterie sèche en dépit de certains inconvénients. Ces avantages se résument comme suit :

— suppression pratiquement totale des phénomènes de rétraction ;
— baisse de la densité des produits.
— obtention d'une couleur et d'un état de surface des produits agréables ;
— friabilité accentuée et masticabilité supérieure ;

CONCLUSION

Cet exposé, basé sur des faits concrets, a permis de préciser ce que les industriels biscottiers et biscuitiers pouvaient attendre d'une utilisation judicieuse des enzymes commerciales mises à leur disposition.

Que les organisateurs de ce symposium en soient vivement remerciés.

SUMMARY

THE USE OF AMYLASES IN FINE BREAD-MAKING, AND PROTEASES IN THE DRY BISCUIT TRADE

Within the field of the biscuit trade, the incorporation of glucamylase is seen to be technically interesting as this enzyme, by catalyzing the direct conversion of starch to glucose, favourizes the fermentation activity of yeast and permits a reduction in time of the last fermentation. The finished products obtained present excellent organoleptic characteristics, notably those which undergo toasting, as the Maillard reaction is increased.

The bacterial alpha-amylases introduced in very weak doses slow down the hardening speed of the bread in the course of time.

In the dry biscuit trade, the addition of proteases reduces or even halts the effects produced by the phenomenon of retraction of doughs, so that the technologist can master the dimensional characteristics of the biscuits which he is manufacturing. Moreover, these articles present low densities and an excellent friableness. Finally, the biscuit manufacturer using proteolytic enzymes, has at his disposal an efficacious means of controlling the harmful effects of excessive protein content of some of the flours he may be brought to use.

ZUSAMMENFASSUNG

EINSATZ VON AMYLASEN IN DER FEINBÄCKEREI UND VON PROTEASEN IN DER BISKUITBÄCKEREI

Auf dem Gebiet der Feinbäckerei ist die Zugabe von Glucamylase technisch interessant, da dieses Enzym durch Katalysierung der direkten Unwandlung von Stärke in Glucose die Gärung aktiviert und Zeitersparnis für die letzte Gärungsstufe ermöglicht. Die Endprodukte haben ausgezeichnete organoleptische Eigenschaften, insbesondere die einem Röstprozess unterzogenen infolge der Akzentuierung der Maillard-Reaktion.

Die in sehr geringen Mengen zugesetzen Bakteriellen Alpha-Amylasen verlangsamen im Zeitverlauf die Geschwindigkeit des Altwerdens der Brotkrume.

Bei der Biskuitherstellung führt die Zugabe von Proteasen zur Verminderung und selbst zur Aufhebung der durch die Teigzusammenziehung bewirkten Nachteile, so dass der Techniker die Abmessungen der zu produzierenden Ware beherrschen kann. Diese Ware zeichnet sich ferner durch geringe Dichte und eine sehr gute Zerreibbarkeit aus. Schliesslich verfügt der Biskuithersteller, der sich proteolytischer Enzyme bedient, über ein wirksames Mittel zur Bekämpfung der nachteiligen Folgen eines zu hohen Proteingehaltes gewisser Mehle.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 267-286.

EMPLOI DES ENZYMES EN GLUCOSERIE

R. DELECOURT

Société RAPIDASE,
15, rue des Comtesses, 59 - Seclin (France)

RÉSUMÉ

Comme ce sujet a déjà fait l'objet de nombreuses conférences portant sur les procédés et les matériels, nous étudierons plutôt les propriétés particulières des enzymes dans les conditions technologiques de la glucoserie, en suivant l'ordre logique des procédés.

Comme l'action des amylases sur l'amidon cru est encore trop lente, on doit faire agir les enzymes sur l'empois d'amidon. Les procédés et matériels existants se ramènent à deux types :

1. on porte rapidement la suspension d'amidon à la température d'action des amylases (matériel Kroyer, jet cooker), ce qui amène une augmentation brutale de viscosité ;
2. on coule le lait d'amidon cru dans la solution d'amidon déjà liquéfié, ce qui élimine la pointe de viscosité mais peut augmenter la température de gélification.

L'α-amylase bactérienne est tout à fait adaptée à la liquéfaction de l'amidon. Sa grande résistance à haute température est encore améliorée par la protection due à la concentration élevée en substrat. Le phénomène de liquéfaction est influencé par la présence de l'ion calcium. Ce dernier élargit sensiblement la zone de pH où l'enzyme est active, et augmente l'activité enzymatique de telle sorte que la viscosité finale de la solution est plus basse. Au cours d'une liquéfaction industrielle, nous avons suivi l'évolution de plusieurs paramètres (viscosité, DE, coloration à l'iode, activité enzymatique restante, vitesse de filtration) en fonction du pH, de la température et de la dose d'amylase.

L'empois d'amidon naturel peut contenir des composés modifiés comme l'amidon rétrogradé et le complexe amidon corps-gras. L'amidon rétrogradé est extrêmement gênant au point de vue filtration ; il ne peut pas être hydrolysé complètement par les amylases et est difficile à mettre en évidence. Le complexe amidon corps gras est hydrolysé lentement, mais néanmoins complètement.

Les maltodextrines fabriquées par l'amylase bactérienne peuvent être utilisées telles quelles, mais elles servent le plus souvent de produits intermédiaires à la fabrication de sirops plus hydrolysés. L'amylase fongique ou l'amylase de malt donnent des sirops à haute teneur en maltose, qui trouvent leur emploi en confiserie. L'amyloglucosidase permet l'obtention en quelques jours de solution contenant au moins 95 p. 100 de glucose vrai. Dans ce cas, on peut aussi utiliser une préliquéfaction acide, mais cette dernière provoque très facilement l'apparition de produits de réversion ou isomérisés qui diminuent le rendement final en glucose. L'emploi en laboratoire d'amyloglucosidase purifiée et donc totalement exempte de transglucosidase semble montrer que la réaction d'hydrolyse qu'elle catalyse pourrait être réversible et donc reformer des diholosides à partir du glucose.

L'emploi d'une enzyme comme la glucose isomérase permet d'obtenir un sirop contenant des quantités appréciables de fructose.

Enfin, cette industrie s'intéresse fortement aux techniques d'insolubilisation des enzymes, car l'emploi de ces dernières ne changera en rien la technologie de traitement des sirops. L'emploi d'une amylase insoluble pour la liquéfaction ne se justifie pas car il sera toujours difficile de la

mettre au contact d'un empois d'amidon. Au contraire, les maltodextrines obtenues par liquéfaction à l'aide de l'amylase, faciles à filtrer, sont la matière première idéale à passer sur colonne d'enzyme insoluble.

Amyloglucosidase et glucose isomérase font actuellement l'objet de traitement d'insolubilisation avec l'espoir de donner des produits industriels, c'est-à-dire donnant un rendement identique avec une durée de vie suffisante.

INTRODUCTION

Ce sujet a déjà fait l'objet de nombreuses conférences qui ont porté tant sur les procédés que sur le matériel. Aussi, je m'en tiendrai à l'étude des propriétés particulières des enzymes dans les conditions technologiques de la glucoserie, en suivant l'ordre normal de la fabrication.

LES AMYLASES

Quoique les alpha-amylases attaquent l'amidon cru, leur vitesse d'hydrolyse est encore trop lente pour espérer actuellement baser un procédé sur une telle action. Il faut d'ailleurs remarquer que cette action est plus forte sur les amidons de céréales et peu importante sur les fécules de tubercules ou de racines, comme l'illustre la figure 1. En 24 heures, à température ambiante, l'alpha-amylase bactérienne dissout 30 p. 100 de l'amidon de blé et 25 p. 100 de celui du maïs ou du manioc. La fécule de pomme de terre est résistante à l'hydrolyse.

On fait donc agir les alpha-amylases sur l'empois d'amidon. L'industrie emploie plusieurs sortes de matériel qui se rangent en deux procédés principaux :

Dans le premier, la suspension d'amidon et d'enzyme est portée brutalement à la température de liquéfaction : mentionnons, par exemple, le chauffage dans un ensemble de tubes concentriques (procédé Kroyer), ou l'injection directe de vapeur au moyen d'injecteurs spécialement dessinés (jet cooker). On observe dans ce procédé une augmentation brutale mais passagère de viscosité qui s'oppose à la circulation et à l'échange des fluides, solutions et vapeur.

On peut éliminer cette pointe de viscosité en ménageant des pauses de liquéfaction à des températures bien précises (courbe 2) : voici ce phénomène illustré pour la liquéfaction en discontinu de l'amidon de maïs. L'essai a été effectué sur Viscographe Brabender. La montée directe à 95°C provoque un pic de viscosité apparente de 400 cps mesurée comparativement à une solution de glycérine. Une pause de 10 mn à 68°C réduit le phénomène à l'apparition de deux petites bosses de viscosité. Ceci semble en relation avec le diagramme de gonflement de l'amidon de maïs en l'absence d'enzyme, diagramme qui montre une gélification en deux stades.

Dans le second procédé, on utilise la solution d'amidon déjà liquéfiée comme vecteur de calories et l'on coule la suspension d'amidon cru dans la solution chaude d'amidon déjà liquéfié. Le matériel de la firme Stork est basé sur ce principe.

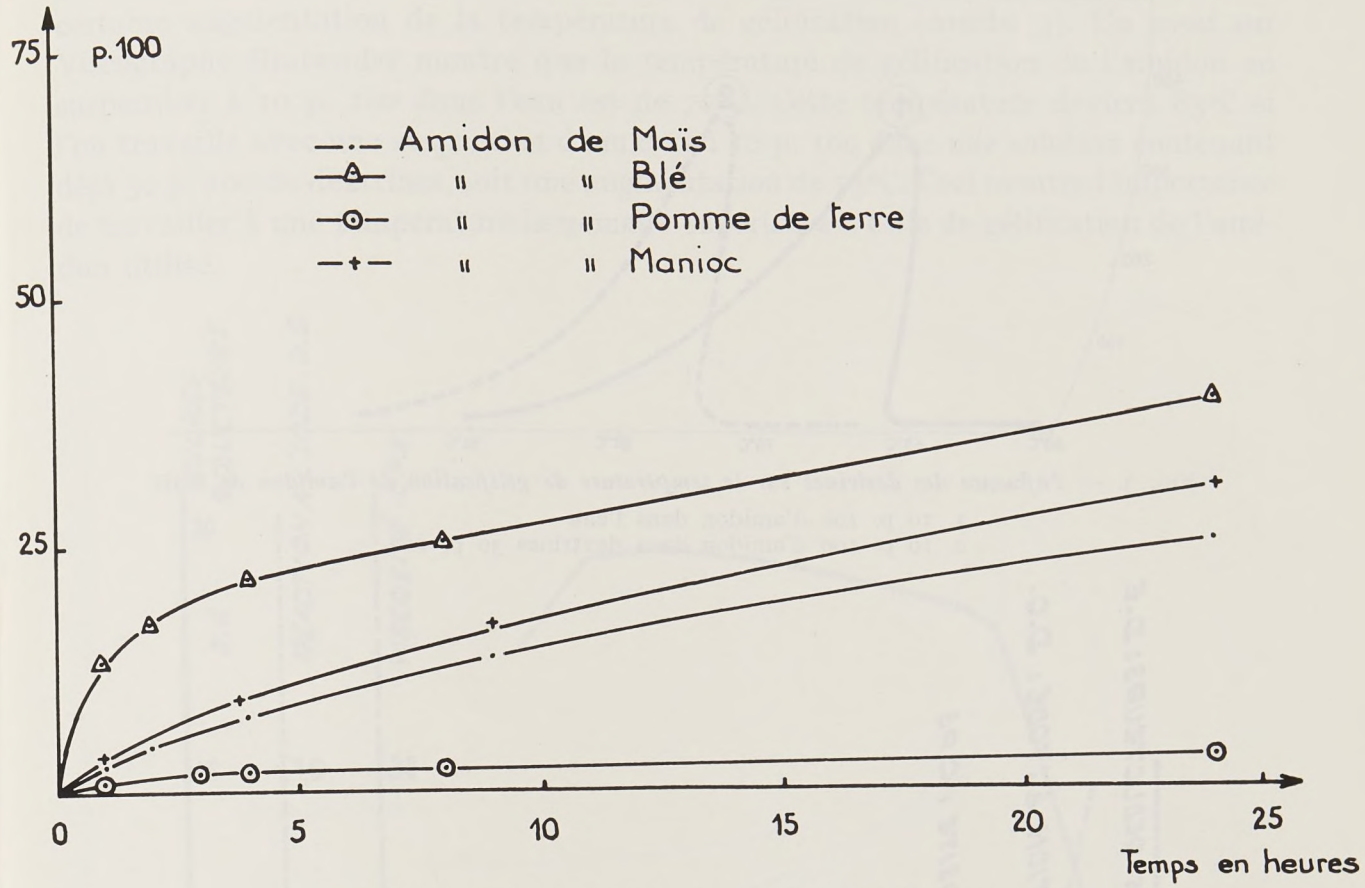


FIG. 1. — *Action de l'alpha-amylase sur l'amidon cru*

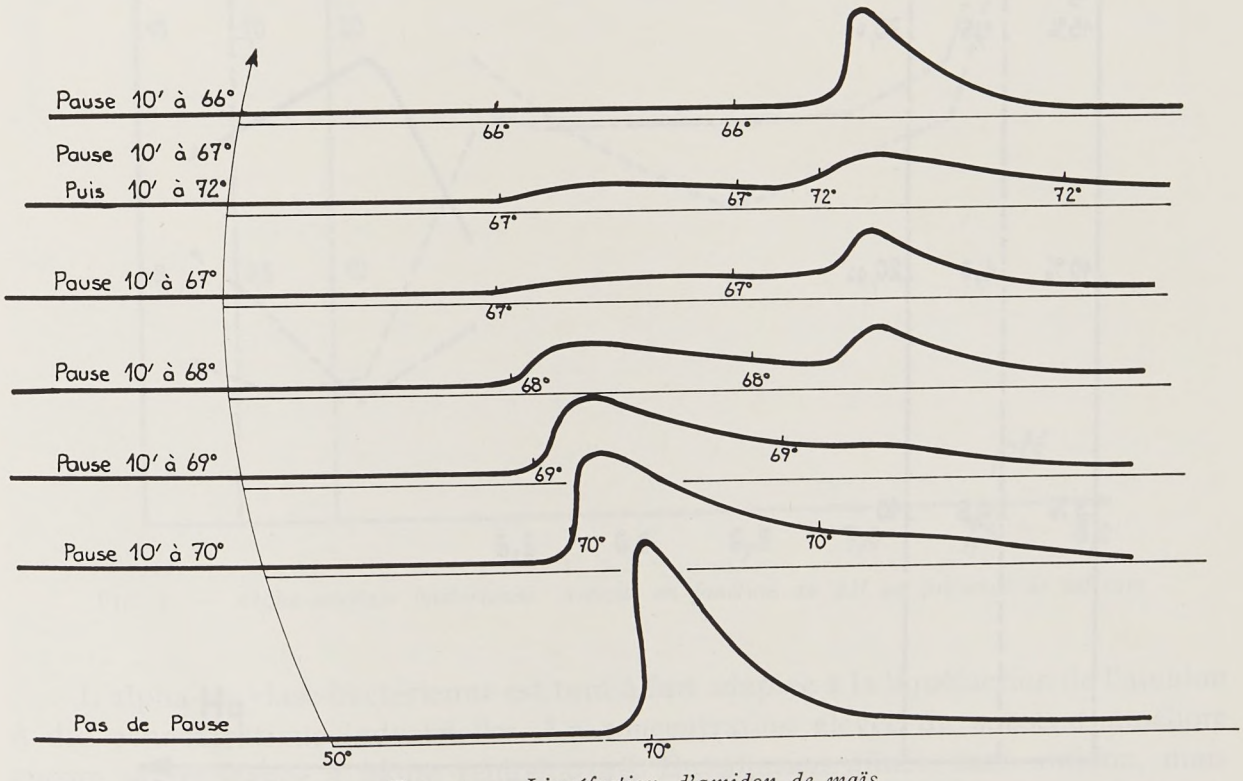


FIG. 2. — *Liquéfaction d'amidon de maïs*

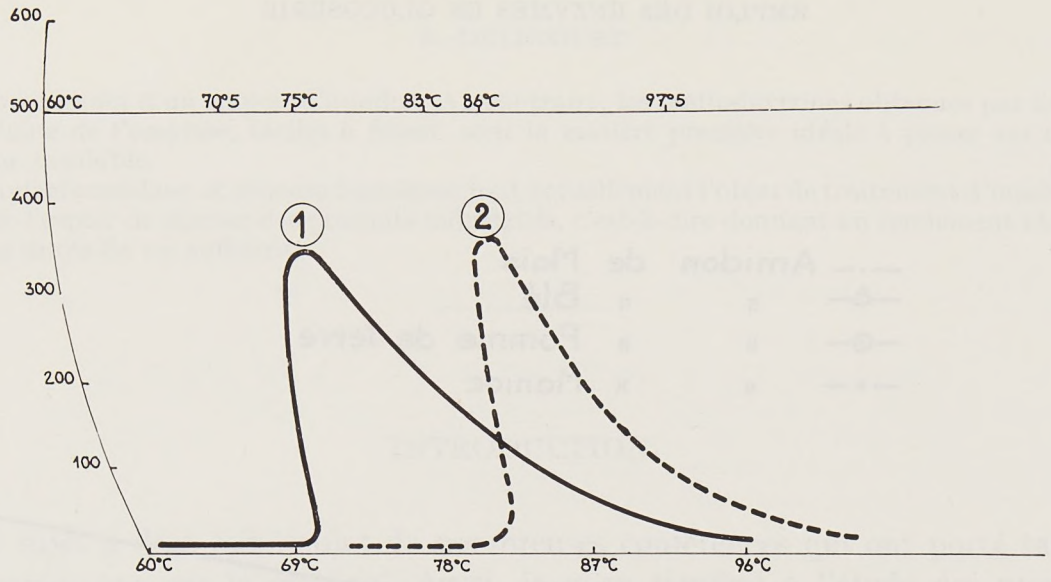


FIG. 3. — *Influence des dextrines sur la température de gélification de l'amidon de maïs*

1. 10 p. 100 d'amidon dans l'eau
2. 10 p. 100 d'amidon dans dextrines 30 p. 100

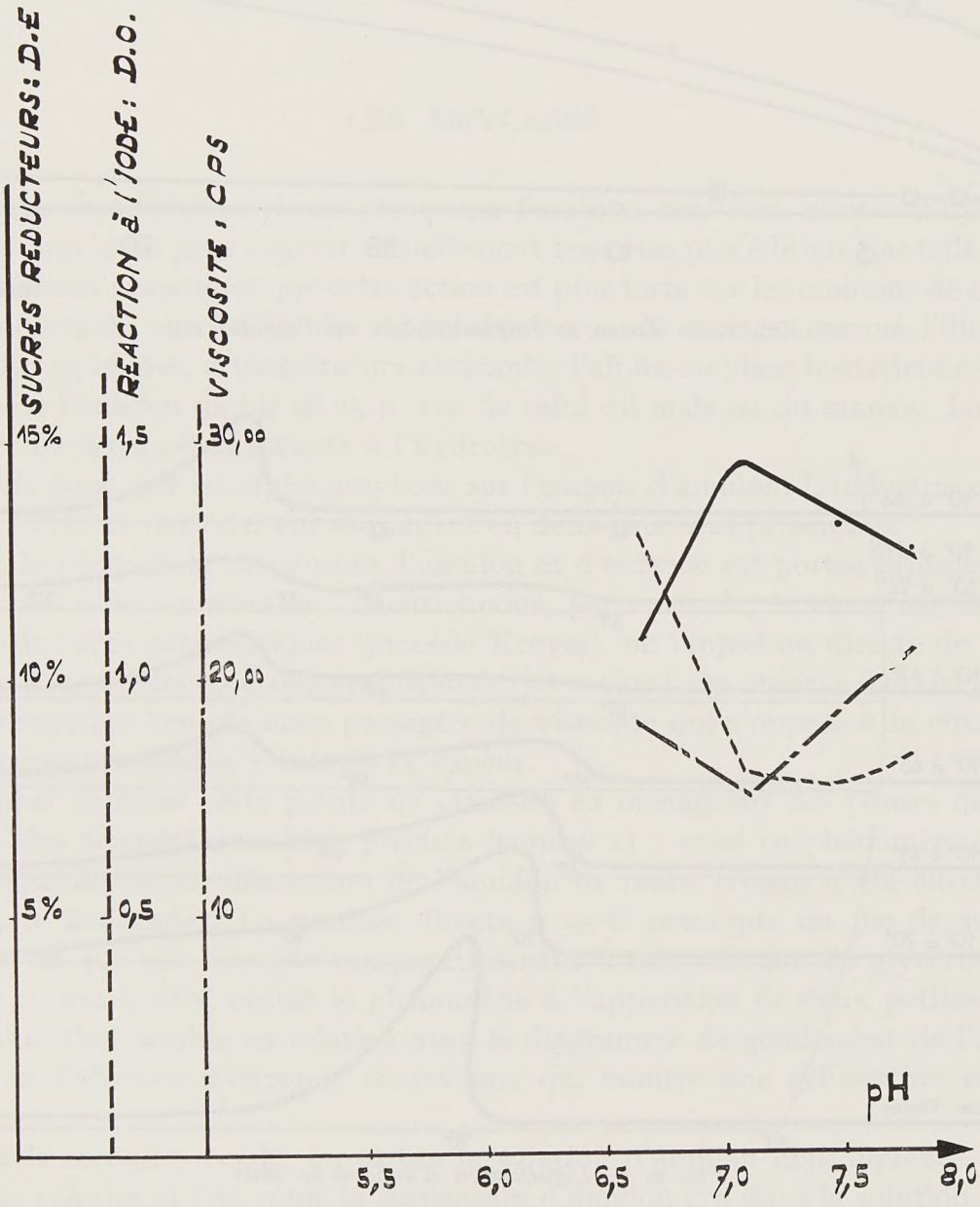


FIG. 4. — *Alpha-amylase bactérienne. Activité en fonction du pH en absence de calcium*

Dans ce cas, il n'y a aucune élévation de viscosité. Mais on peut constater une certaine augmentation de la température de gélification (courbe 3). Un essai sur Viscographe Brabender montre que la température de gélification de l'amidon en suspension à 10 p. 100 dans l'eau est de 70°C. Cette température devient 83°C si l'on travaille avec une suspension d'amidon à 10 p. 100 dans une solution contenant déjà 30 p. 100 de dextrines, soit une augmentation de 13°C. Ceci montre l'importance de travailler à une température largement supérieure à celle de gélification de l'amidon utilisé.

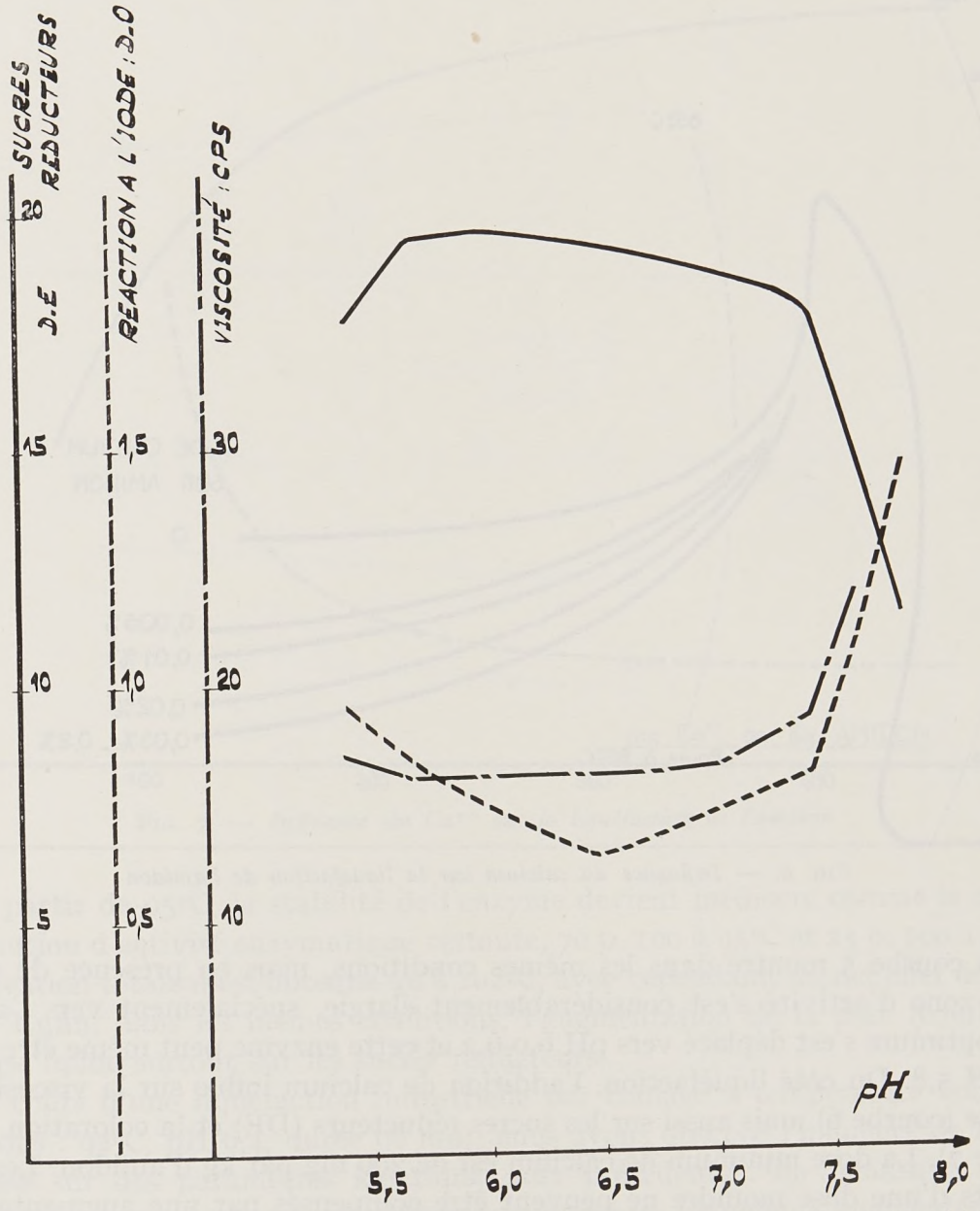


FIG. 5. — *Alpha-amylase bactérienne. Activité en fonction du pH en présence de calcium*

L'alpha-amylase bactérienne est tout à fait adaptée à la liquéfaction de l'amidon à des concentrations industrielles. La concentration élevée du substrat améliore encore sa résistance à haute température. En solution diluée, sans amidon, mais en présence de chlorure, elle conserve 90 p. 100 de son activité après 1 heure de chauffage à 70°C, mais s'inactive rapidement à 80°C. En présence de 35 p. 100 d'amidon,

elle conserve 70 p. 100 de son activité après 1 heure à 90°C et n'est pas totalement inactivée après 1 heure à 100°C.

Le phénomène de liquéfaction et les propriétés de l'amylase sont influencées dans leur ensemble par les ions calcium. En particulier, la zone d'activité en fonction du pH est élargie. La courbe 4 montre par la mesure de la viscosité, de la coloration à l'iode, et des sucres réducteurs que le pH optimum de l'alpha-amylase bactérienne est de 7,2 en l'absence de calcium, avec une courbe d'allure étroite.

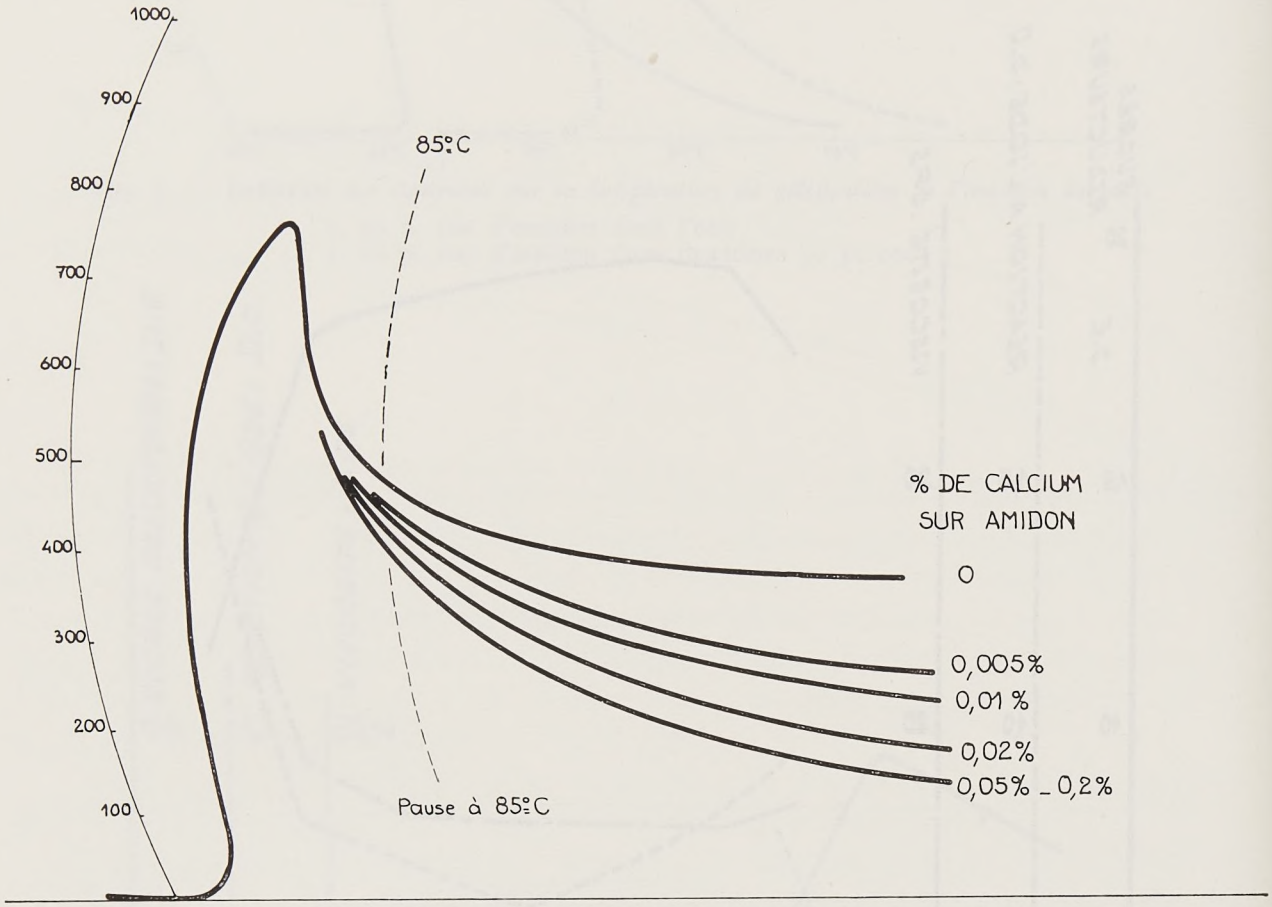


FIG. 6. — *Influence du calcium sur la liquéfaction de l'amidon*

La courbe 5 montre dans les mêmes conditions, mais en présence de calcium que la zone d'activité s'est considérablement élargie, spécialement vers l'acidité : le pH optimum s'est déplacé vers pH 6,0-6,2 et cette enzyme peut même être utilisée vers pH 5,8. Du côté liquéfaction, l'addition de calcium influe sur la viscosité qu'il diminue (courbe 6) mais aussi sur les sucres réducteurs (DE) et la coloration à l'iode (courbe 7). La dose minimum de calcium est de 200 mg par kg d'amidon. Les inconvénients d'une dose moindre ne peuvent être compensés par une augmentation de la concentration en amylase.

Au cours de la liquéfaction d'une suspension d'amidon de maïs à 35 p. 100 sur un matériel pilote (jet cooker) par injection directe de vapeur, nous avons étudié l'influence du pH pour une liquéfaction de 45 mn à 90°C (courbe 8). Cet essai montre les propriétés vraiment industrielles de l'amylase bactérienne : peu d'influence du pH sur la viscosité (17 à 12 cps), les sucres réducteurs (8 à 9 DE) et l'activité enzymatique restante mesurée par la méthode des temps de chute de Hagberg (de

60 p. 100 à 70 p. 100 d'activité enzymatique restante). Puis au pH de 6,5, nous avons mesuré l'influence de la température maintenue pendant 45 minutes (courbe 9). L'évolution est plus intéressante : le taux de sucres réducteurs diminue constamment, alors que la viscosité décroît seulement jusqu'à 95°C. Ceci indique manifestement un changement dans la répartition des sucres, spécialement glucose et mal-

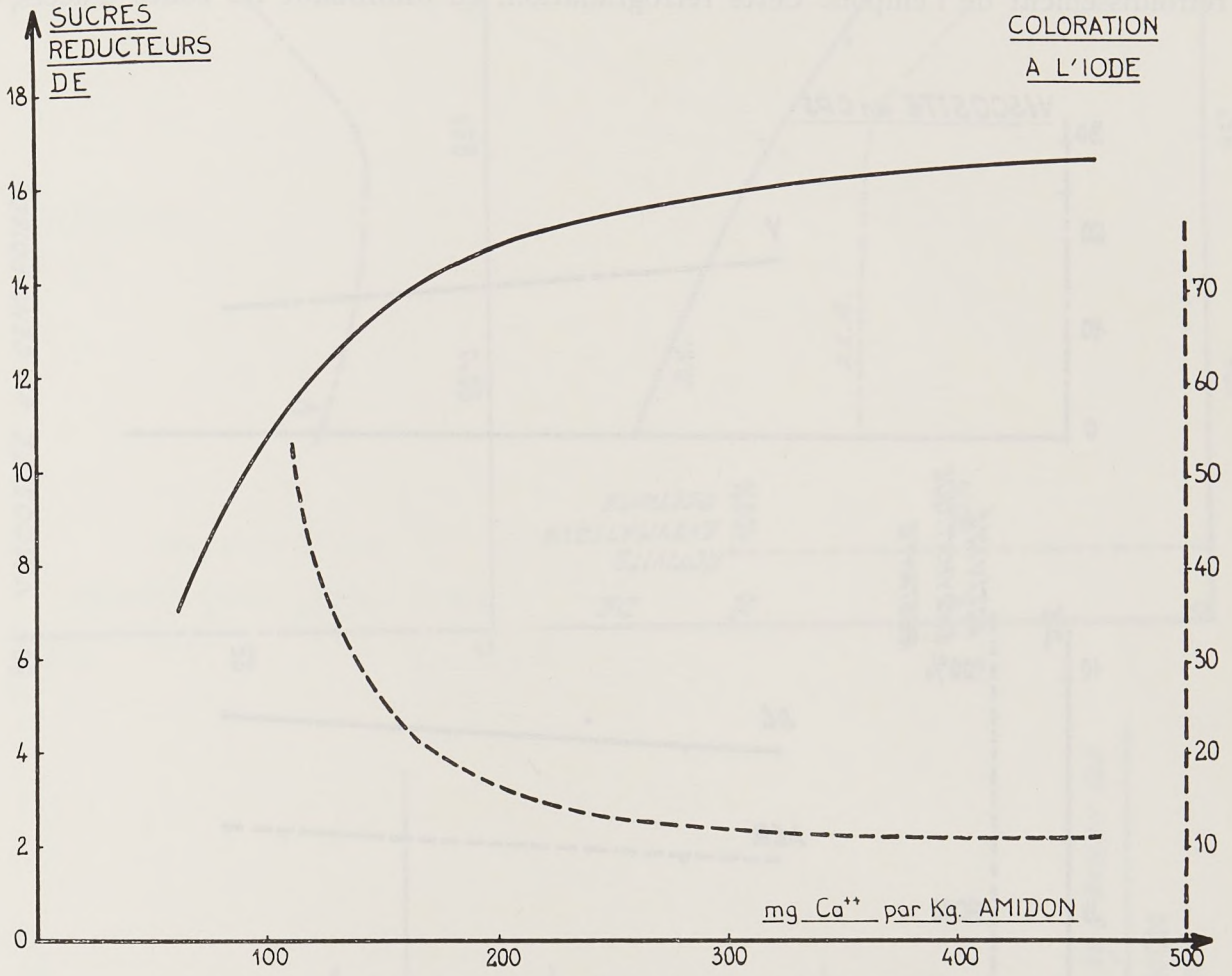


FIG. 7. — *Influence du Ca^{++} sur la liquéfaction de l'amidon*

tose. A partir de 95°C, la stabilité de l'enzyme devient médiocre comme le montre la diminution d'activité enzymatique restante, 70 p. 100 à 95°C et 25 p. 100 à 100°C. L'inactivation totale n'est obtenue qu'à 102°C, avec cependant, un net effet de liquéfaction. Enfin, dans les mêmes conditions, l'augmentation de la dose (courbe 10) d'amylase influe surtout sur les sucres réducteurs.

Au cours d'une liquéfaction industrielle par coulage à température constante (conditions : 92°C, pH 6,4, durée 90 mn), nous avons observé l'influence de la dose d'amylase sur des paramètres identiques aux précédents : on remarque que ce procédé donne des résultats peu différents : les sucres réducteurs augmentent proportionnellement à la dose (courbe 11) ; la coloration à l'iode diminue de façon hyperbolique (courbe 12) ; la viscosité apparente diminue aussi de façon hyperbolique (courbe 13) ; la vitesse de filtration (courbe 14) semble rigoureusement proportionnelle à la dose d'amylase. Elle a été mesurée au laboratoire dans des conditions extrêmement standardisées, et correspond à des vitesses de filtration industrielle de 200 l à 600 l/m²/h.

La vitesse de filtration est aussi dépendante d'un phénomène gênant en glucoserie : la rétrogradation de l'amidon. Il s'agit de l'association de chaînes d'amylose formant des particules, qui, avec le temps, finissent par précipiter. Ce corps peut, paraît-il, préexister dans les grains d'amidon natif. Il se forme facilement aux températures légèrement supérieures à celle de la gélification ou encore s'il y a refroidissement de l'empois. Cette rétrogradation, en diminuant les zones d'accès,

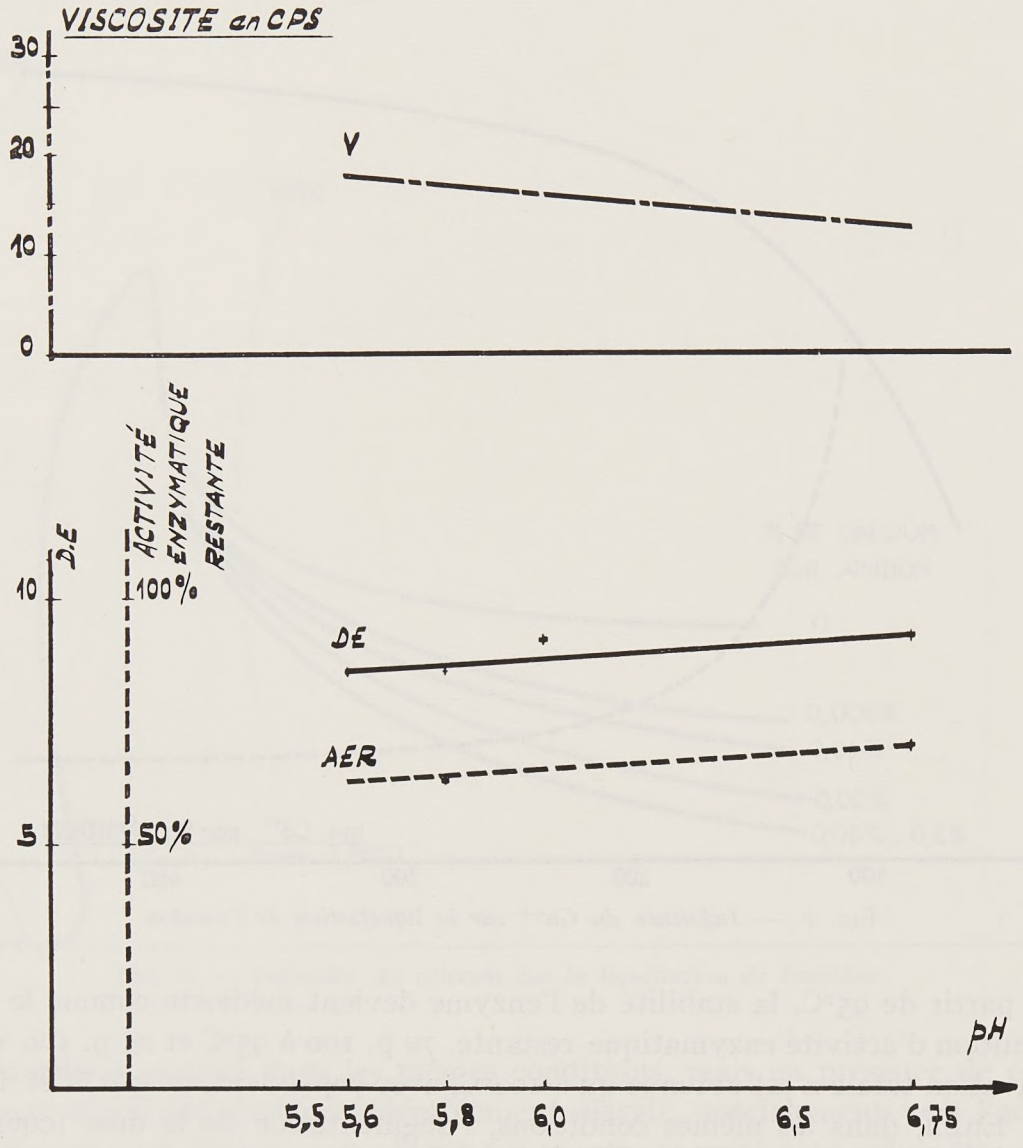


Fig. 8. — *Liquéfaction par injection de vapeur. Influence du pH*

réduit l'affinité de l'amylase et les particules d'amidon rétrogradé deviennent réfractaires à l'hydrolyse enzymatique (courbe 15). Pour le démontrer, on a fait rétrograder à basse température une solution d'amylose. Après centrifugation et lavage, on soumet cette suspension à l'action de l'amylase bactérienne à diverses températures. On suit la progression de l'hydrolyse en dosant le pourcentage d'amylose restant. Après une attaque rapide des fragments de chaîne non associés, l'hydrolyse atteint une limite qui varie peu avec la température.

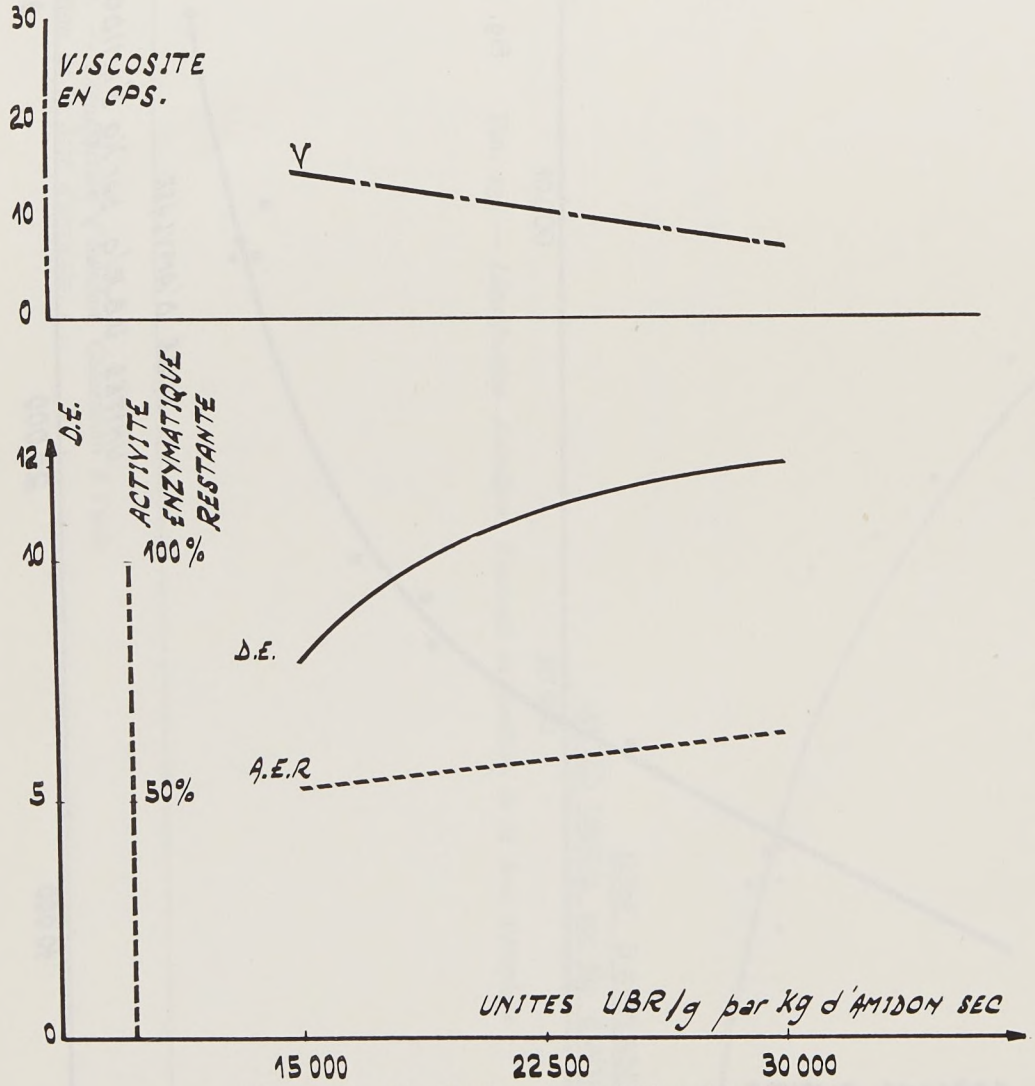


FIG. 9. — *Liquéfaction par injection de vapeur. Influence de la température*

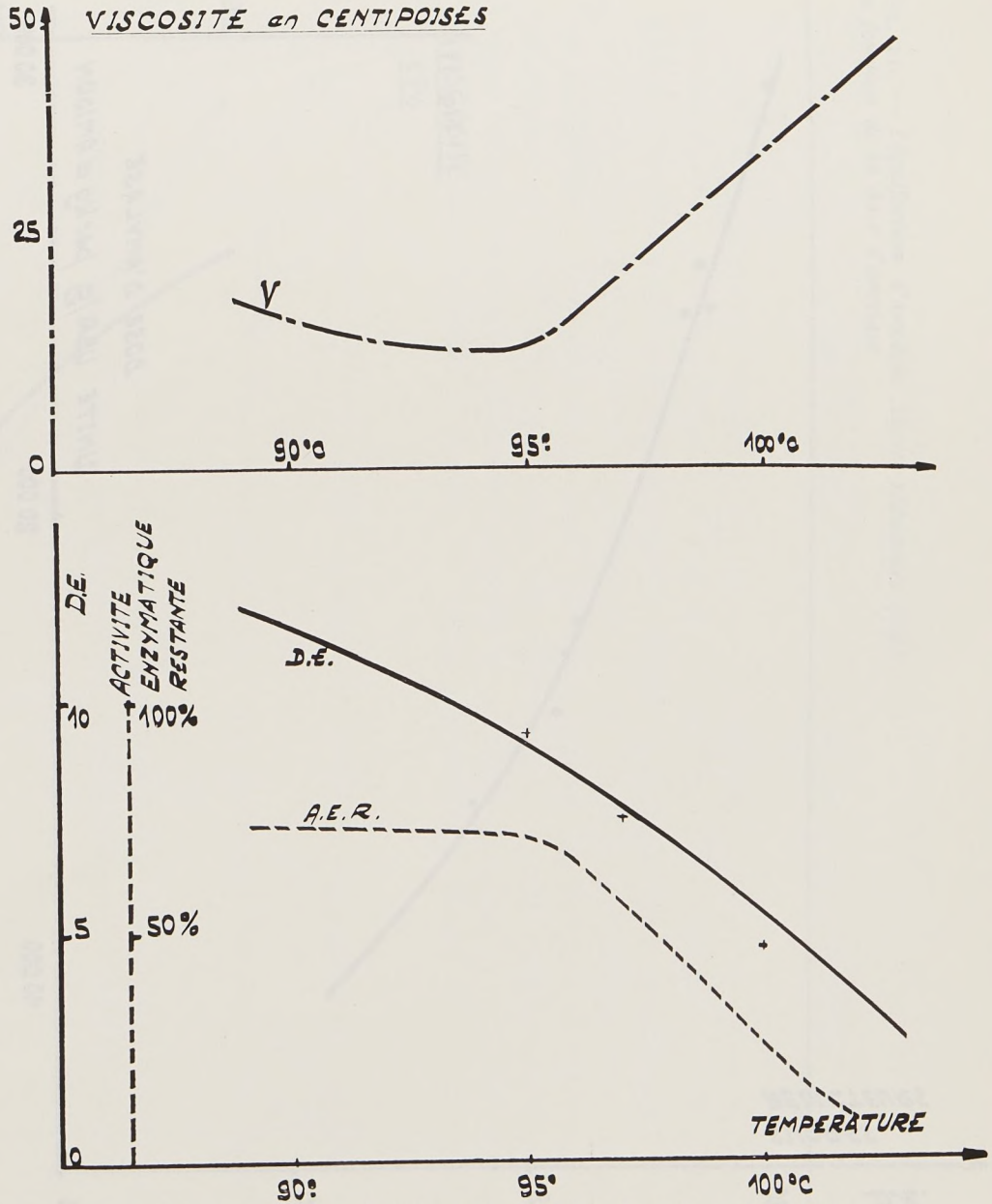


FIG. 10. — *Liquéfaction par injection de vapeur. Influence de la dose d'amylase bactérienne*

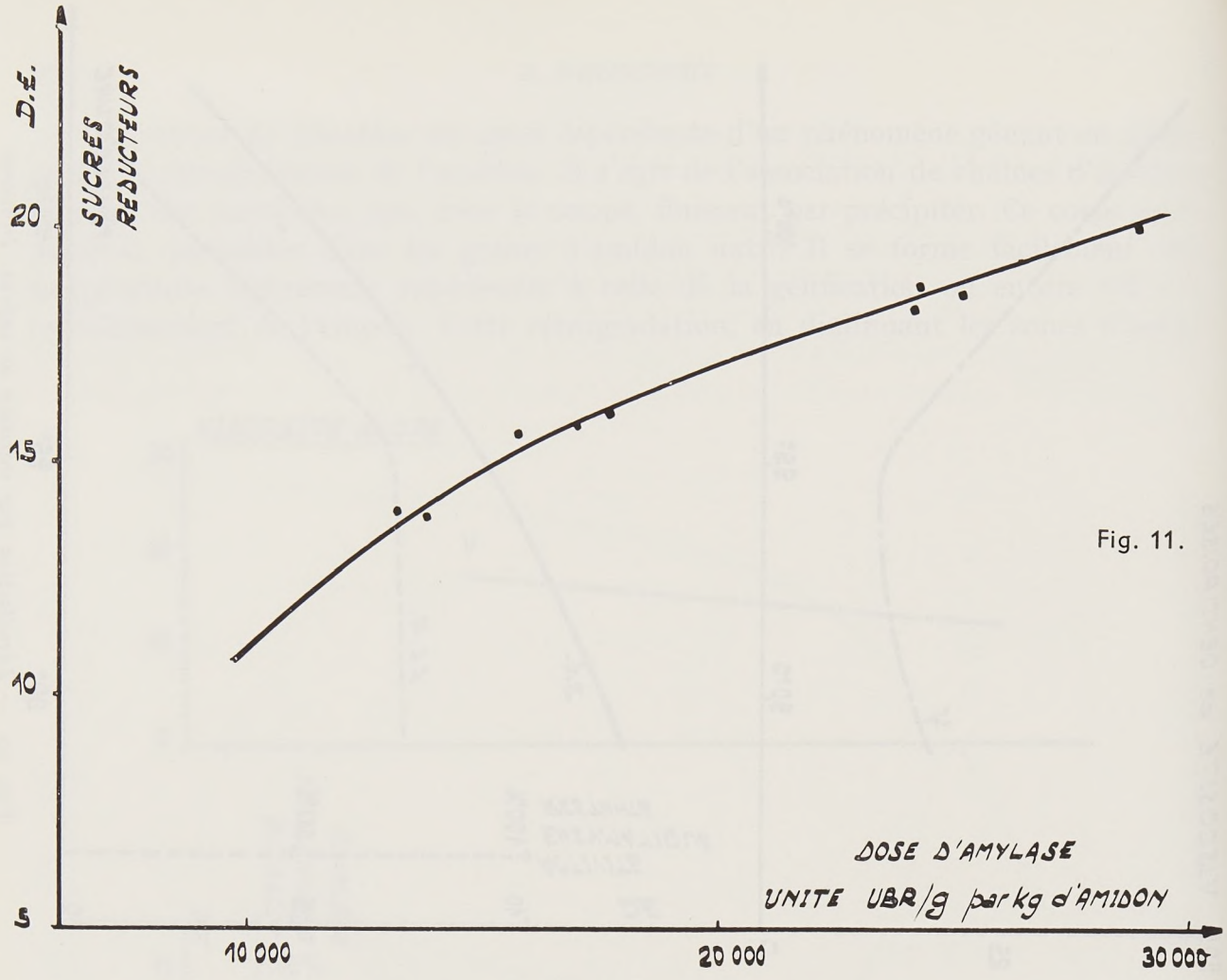

D.E.
SUCRES
REDUCTEURS
20
15
10
5
DOSE D'AMYLASE
UNITE UBR/g par kg d'AMIDON
10 000
20 000
30 000

Fig. 11.

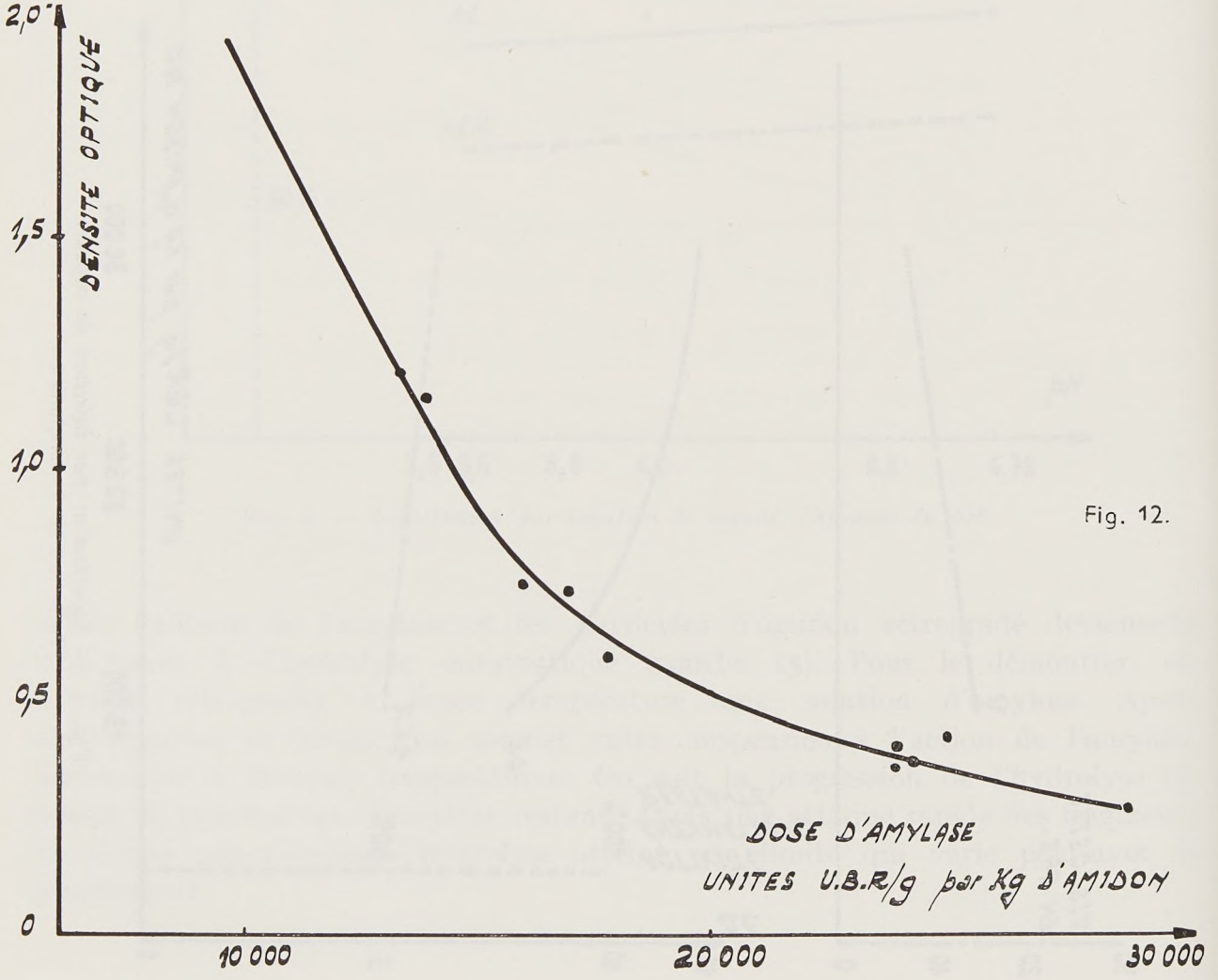

2,0
DENSITE OPTIQUE
1,5
1,0
0,5
0
DOSE D'AMYLASE
UNITES U.B.R/g par Kg D'AMIDON
10 000
20 000
30 000

Fig. 12.

FIG. 11. — *Liquéfaction d'amidon. Sucres réducteurs* (DE) *en fonction de la dose d'amylase*

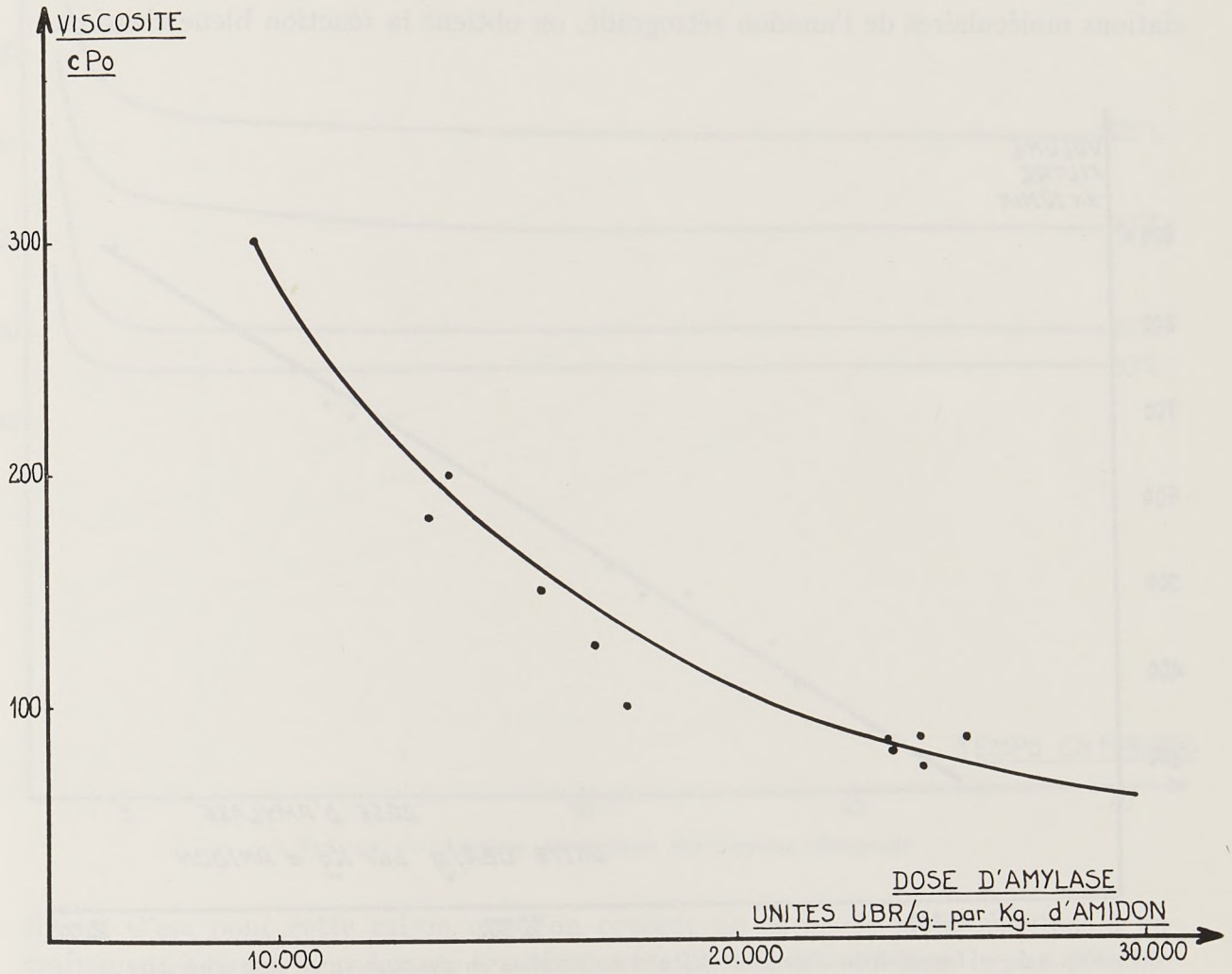


FIG. 13. — *Liquéfaction d'amidon. Viscosité en fonction de la dose d'amylase*

FIG. 12. — *Liquéfaction d'amidon. Coloration à l'iode en fonction de la dose d'amylase*

L'amylase hydrolyse	30	p.	100	de	l'amidon rétrogradé à	20°C
—	40	—	—	—	—	50°C
—	50	—	—	—	—	70°C
—	55	—	—	—	—	80°C

Mais il convient de noter un phénomène intéressant. L'amylose rétrogradé donne évidemment la réaction bleue à l'iode. Mais, lorsque l'hydrolyse limite par l'amylase est atteinte, on obtient, par action directe de l'iode sur la suspension, un liquide et un précipité jaunes. Mais si avant d'effectuer cette réaction à l'iode, on dissout la suspension dans la soude normale ou la diméthylsulfoxyde, ce qui détruit les associations moléculaires de l'amidon rétrogradé, on obtient la réaction bleue classique.

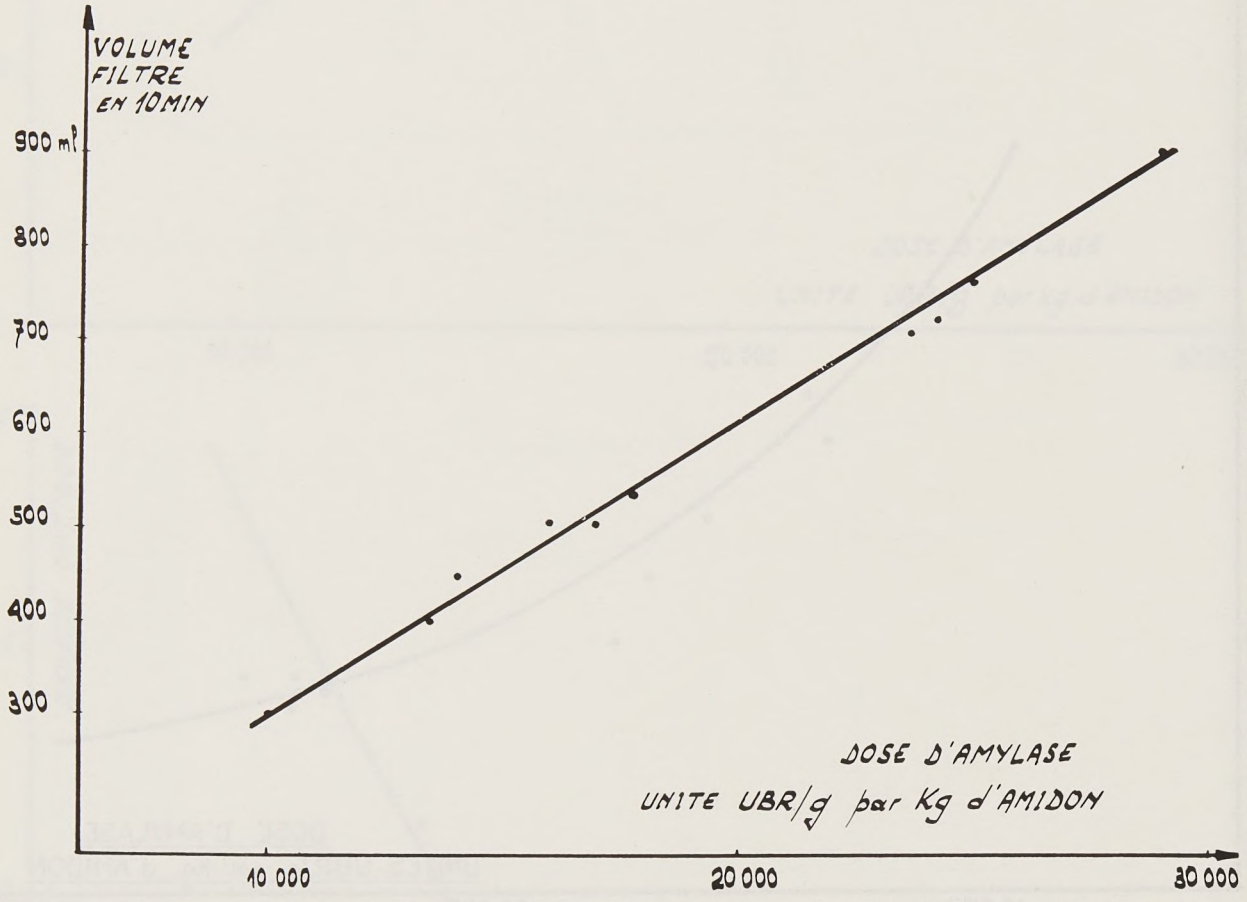


FIG. 14. — *Liquéfaction d'amidon. Vitesse de filtration en fonction de la dose d'amylase*

Nous savons en effet que la réaction à l'iode ne peut être obtenue que si l'amylose peut se former en structure hélicoïdale. Cette même disposition hélicoïdale se rencontre avec de nombreux précipitants de l'amylose qui sont des substances à forte polarité. En effet, l'amylose forme à chaud un précipité amorphe avec les acides gras ou les corps gras polaires qu'on peut rencontrer dans les diverses graines. Mais alors que l'amylose rétrogradé est inattaquable par les amylases, il est hydrolysé totalement, quoique plus lentement, sous sa forme de précipité complexe (amylose-corps gras) (courbe 16). Pour mettre ceci en évidence, on a précipité de l'amylose par un excès de produit actif : butanol, acide oléique, corps gras polaire comme un monoglycéride. Les précipités obtenus ont été soumis à l'action de l'amylase bacté-

rienne à 50°C. Les diverses courbes indiquent pour chaque précipité la vitesse d'hydrolyse variable évidemment selon la formule et la structure moléculaire des corps gras.

Ces deux problèmes amidon rétrogradé ou précipité par les corps gras sont en relation étroite avec la vitesse de filtration en glucoserie. En effet, ils se présentent sous forme de suspension colloïdale très gonflée qui colmate très rapidement les

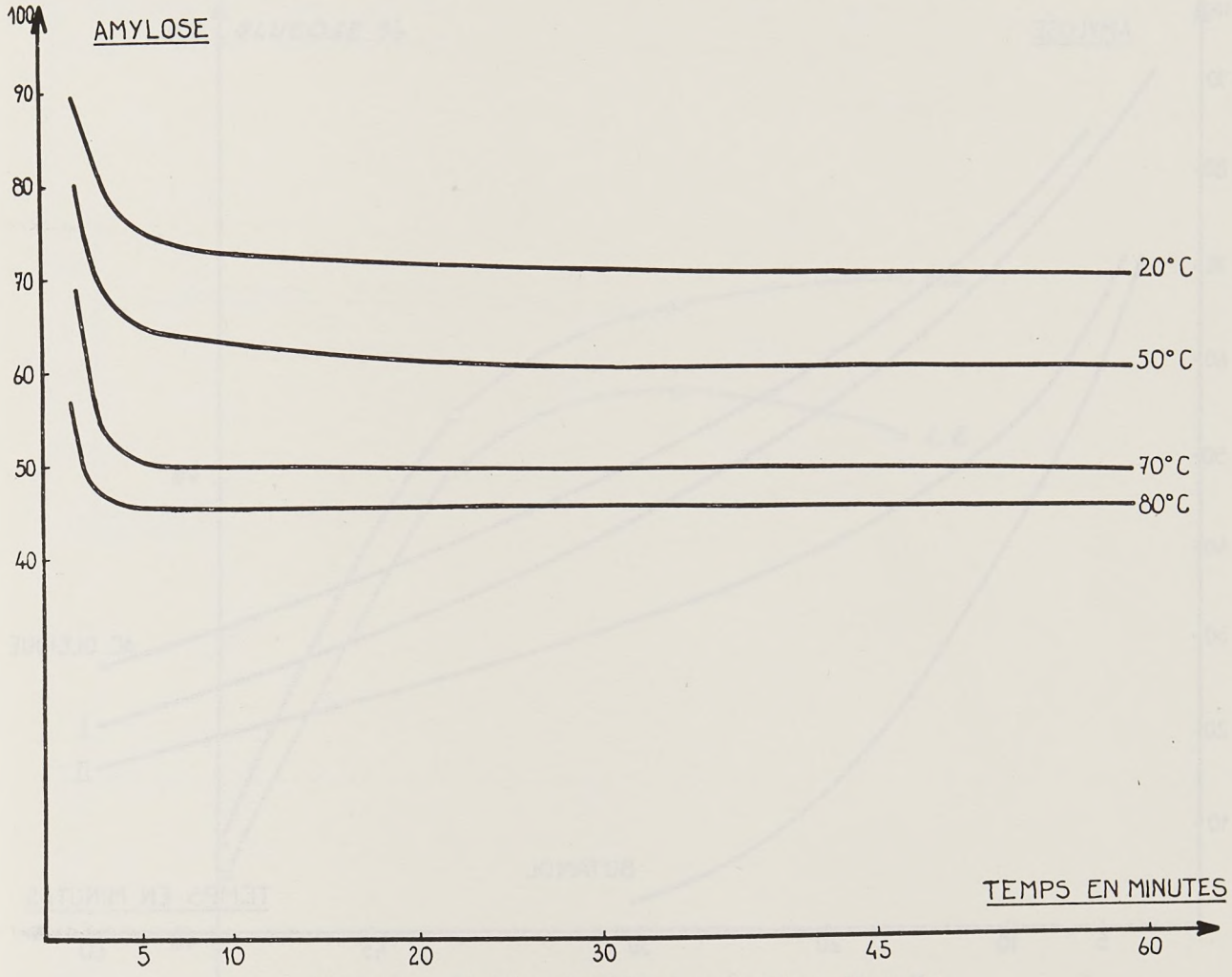


FIG. 15. — *Amylase bactérienne sur amylose rétrogradé*

filtres. C'est pour cette raison que l'on procède au cours de la liquéfaction à un traitement à haute température (120°C) dont le but est de solubiliser le plus possible l'amidon non gélifié ou en cours de rétrogradation. On soumet ensuite ces fractions d'empois d'amidon à une hydrolyse quasi instantanée par une nouvelle quantité d'amylase, ajoutée le plus vite possible à la solution d'amidon refroidie par détente.

Les maltodextrines fabriquées par l'amylase bactérienne peuvent être utilisées telles quelles. En effet, cette amylase permet d'obtenir en 24 heures à 70°C des sirops à 37 DE. Il s'agit d'un mélange de polysaccharides contenant 6,3 p. 100 de glucose, 15,6 p. 100 de maltose, 16,3 p. 100 de maltotriose. Ces sucres sont dus à l'attaque au hasard de l'amylase bactérienne qui, en fait, n'a plus aucune affinité pour les polysaccharides contenant moins de 5 unités glucose. Généralement, ces maltodextrines servent le plus souvent de produits intermédiaires pour la fabrication de sirops plus hydrolysés.

Les alpha-amylases fongiques, du fait de leur affinité pour les plus petits polysaccharides, permettent d'obtenir des sirops à 60-65 DE qui contiennent plus de glucose que de maltose. Par contre, l'utilisation de la diastase du malt riche en bêta-amylase conduit à des sirops à haute teneur en maltose, qui ont des applications technologiques particulières.

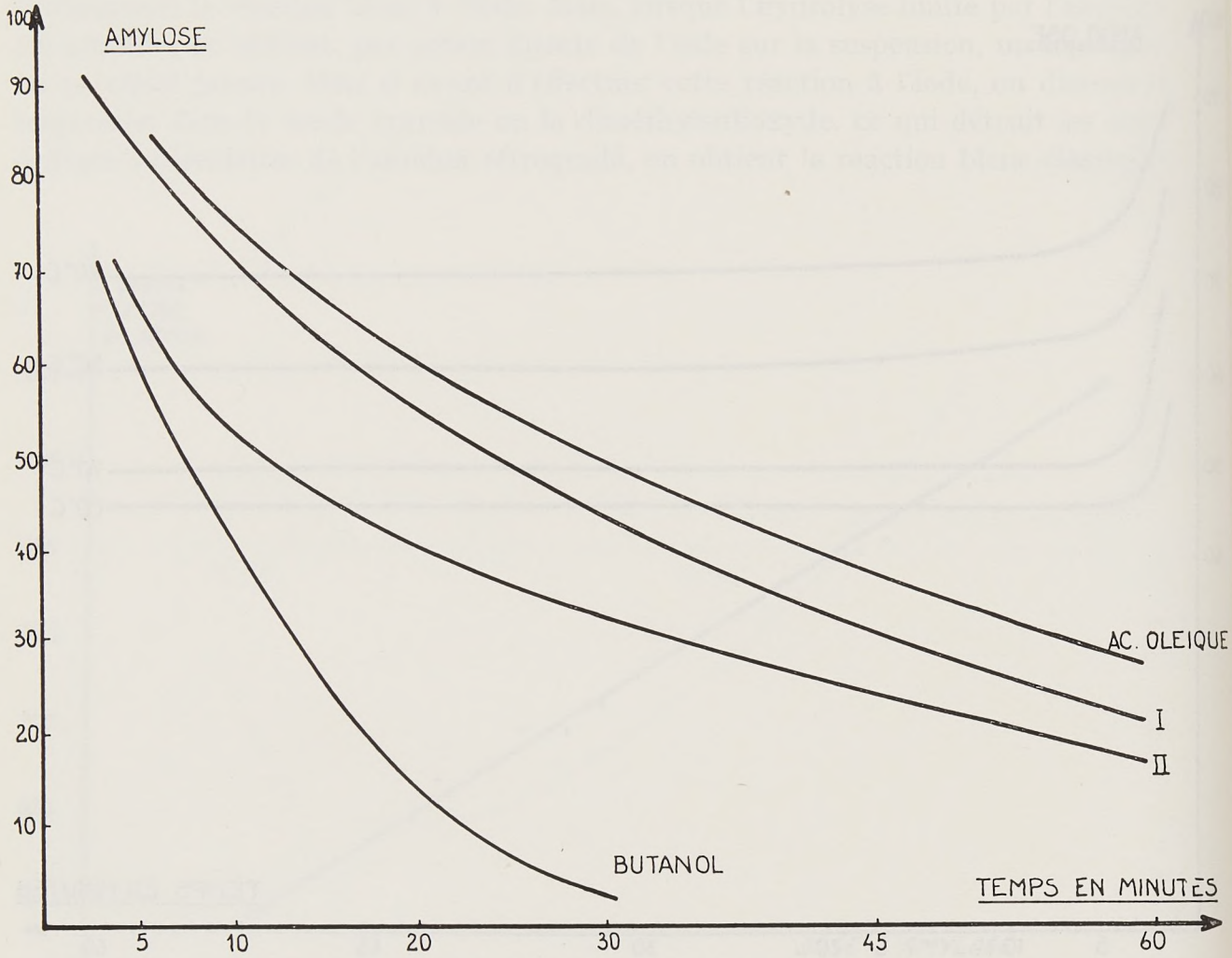


Fig. 16. — *Amylase bactérienne sur amylose précipité*

L'AMYLOGLUCOSIDASE

Un débouché fort intéressant des enzymes en glucoserie est évidemment la fabrication du glucose pur. L'utilisation d'amyloglucosidase permet d'obtenir en 3 ou 4 jours un sirop titrant de 92 à 95 p. 100 de glucose vrai, à partir d'amidon liquéfié. Lorsque cette liquéfaction est encore effectuée à l'acide, la fabrication de produits en réversion est plus importante et le titre final en glucose est diminué. Par contre, l'emploi du procédé double enzyme a permis de réduire le taux de ces produits constitués principalement d'isomaltose et panose, et d'améliorer le rendement (courbe 17).

On observe pour le produit préalablement liquéfié à l'acide, la présence de pro-

duits de réversion qui provoquent à partir de 72 heures une diminution sensible de la teneur en glucose utilisé pour la synthèse d'isomaltose.

L'origine même de l'amyloglucosidase a une certaine influence sur le rendement final (courbe 18). L'amyloglucosidase de *Rhizopus* donne un résultat légèrement différent de celle d'*Aspergillus niger*, quoique celle-ci ait une vitesse initiale plus

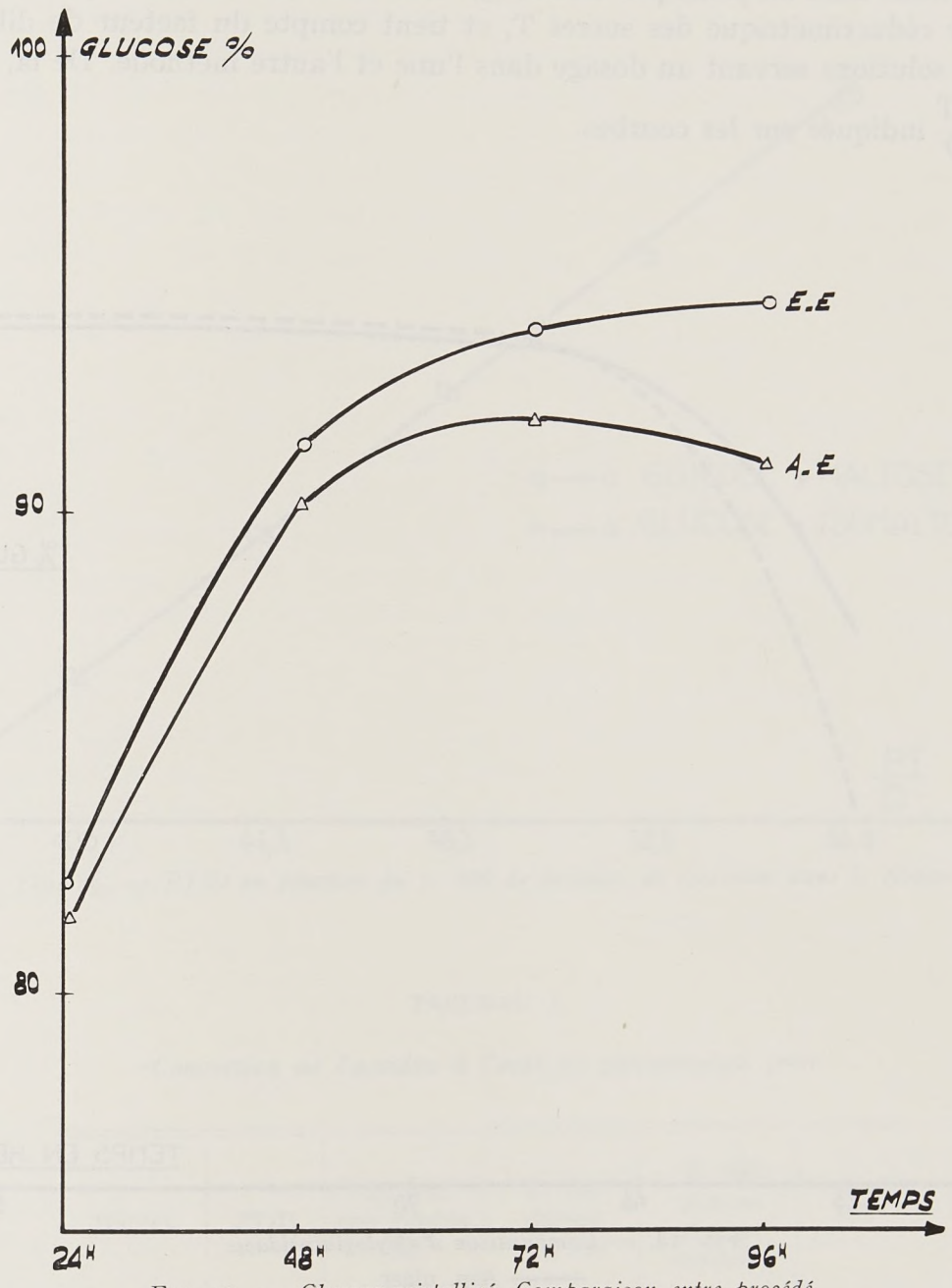


FIG. 17. — *Glucose cristallisé. Comparaison entre procédé*
acide-enzyme △——△
double-enzyme ○——○

importante. Pour expliquer de telles différences, on pourrait penser à la présence plus ou moins importante de transglucosidase. Cependant, il a été prouvé récemment que même les enzymes purifiées pouvaient, lorsque les conditions sont favorables, déplacer l'équilibre de l'hydrolyse dans le sens de la réversion.

UNDERKOFLER (1), NAKAMURA (2) et FUKUMOTO ont démontré que, en présence

de 50 p. 100 de glucose, les amyloglucosidases purifiées de quelque origine que ce soit (*Aspergillus niger, Rhyzopus ou Endomyces*) provoquent toutes la transglucosidation du glucose en isomaltose et en ses homologues. Comme les quantités formées sont petites et qu'aucune méthode de détection n'est vraiment satisfaisante, surtout à cause du temps qu'elles demandent, il me paraît intéressant de signaler la méthode expérimentale mise au point par Cayle (3). Elle combine à la fois la polarisation P, le dosage réductimétrique des sucres T, et tient compte du facteur de dilution D entre les solutions servant au dosage dans l'une et l'autre méthode. De là, vient la valeur $\frac{PT}{D}$ indiquée sur les courbes.

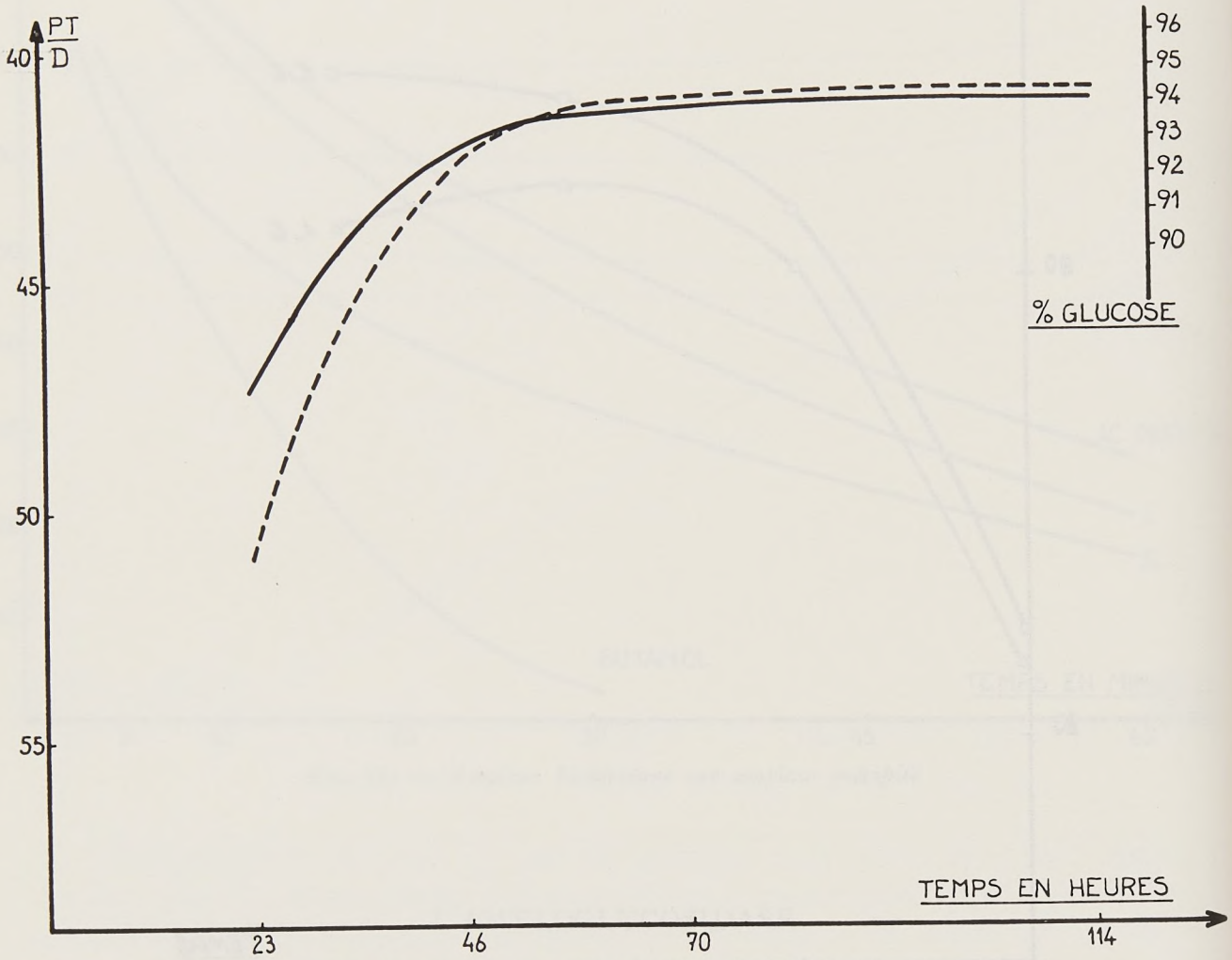


Fig. 18. — *Comparaison d'amyloglucosidases*
——— Asp. niger
- - - - Rhizopus

On a observé que cette valeur $\frac{PT}{D}$ était proportionnelle à la teneur du glucose en sucre de réversion, que ce soit maltose ou isomaltose, et que les droites obtenues étaient superposables (courbe 19). Cette méthode a l'avantage de ne pas nécessiter de dosage de matière sèche contrairement à la méthode du DE qui se révèle moins précise (tabl. 1).

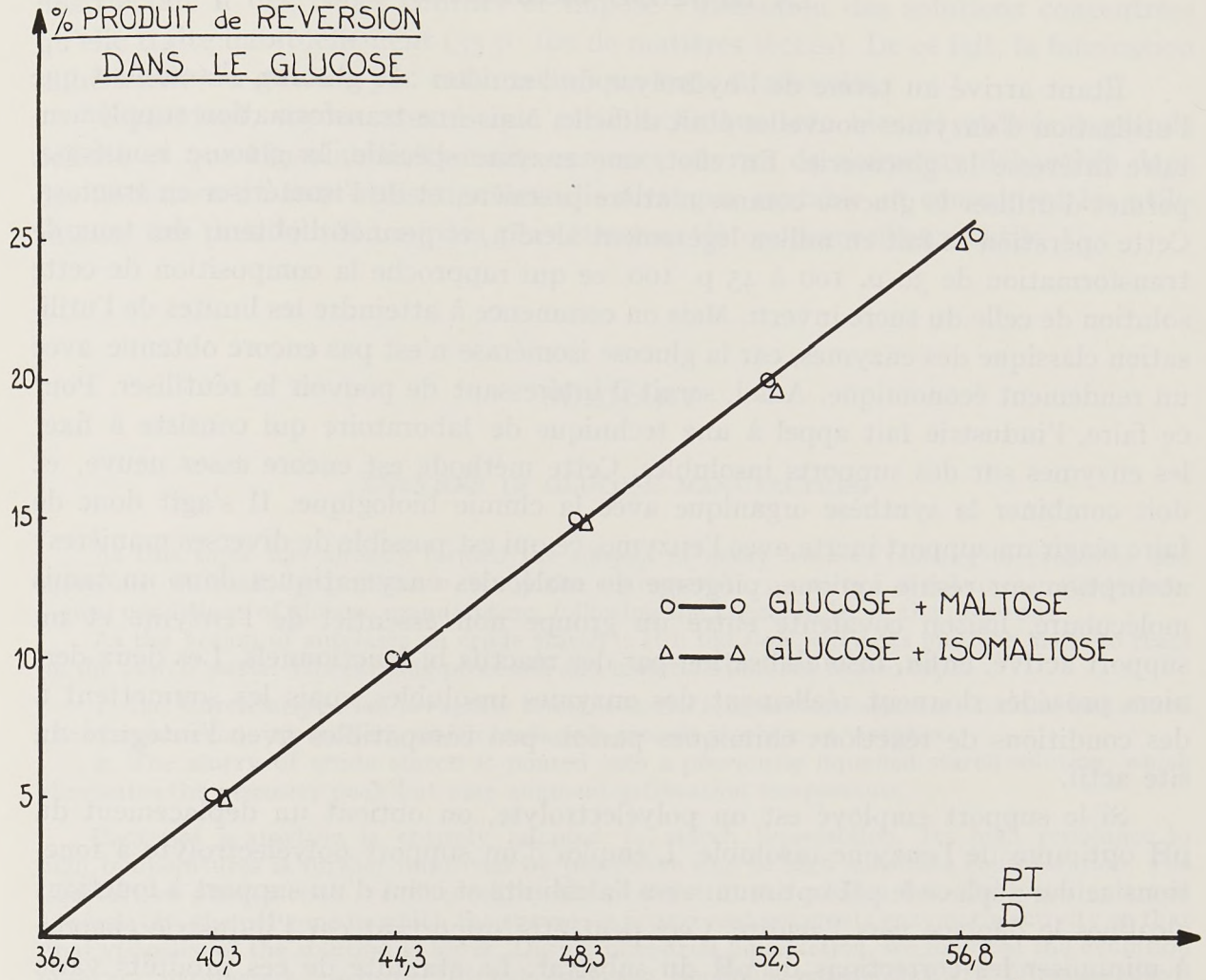


FIG. 19. — *PT/D en fonction du p. 100 de produits de réversion dans le glucose*

TABLEAU I

Conversion de l'amidon à l'aide de glucoamylase pure

Heures	PT/D	P. 100 non glucose (x)	P. 100 glucose ($100-x$)	P. 100 glucose (glucose-oxydase)	DE
24	46,1	12,6	87,4	87,5	90,2
36	43,4	9,0	91,0	91,8	93,2
48	41,5	6,4	93,6	93,4	94,1
60	40,8	5,4	94,6	94,1	95,3
72	40,2	4,8	95,2	95,0	96,3

LA GLUCOSE ISOMÉRASE

Étant arrivé au terme de l'hydrolyse de l'amidon : le glucose, il semblait que l'utilisation d'enzymes nouvelles était difficile. Mais une transformation supplémentaire intéresse la glucoserie. En effet, une enzyme spéciale, la glucose isomérase, permet d'utiliser le glucose comme matière première, et de l'isomériser en fructose. Cette opération se fait en milieu légèrement alcalin, et permet d'obtenir des taux de transformation de 30 p. 100 à 45 p. 100, ce qui rapproche la composition de cette solution de celle du sucre inverti. Mais on commence à atteindre les limites de l'utilisation classique des enzymes, car la glucose isomérase n'est pas encore obtenue avec un rendement économique. Aussi, serait-il intéressant de pouvoir la réutiliser. Pour ce faire, l'industrie fait appel à une technique de laboratoire qui consiste à fixer les enzymes sur des supports insolubles. Cette méthode est encore assez neuve, et doit combiner la synthèse organique avec la chimie biologique. Il s'agit donc de faire réagir un support inerte avec l'enzyme, ce qui est possible de diverses manières : absorption sur résine ionique, piégeage de molécules enzymatiques dans un tamis moléculaire, liaison covalente entre un groupe non essentiel de l'enzyme et un support activé, enfin, insolubilisation par des réactifs bi-fonctionnels. Les deux derniers procédés donnent réellement des enzymes insolubles, mais les soumettent à des conditions de réactions chimiques parfois peu compatibles avec l'intégrité du site actif.

Si le support employé est un polyélectrolyte, on obtient un déplacement du pH optimum de l'enzyme insoluble. L'emploi d'un support polyélectrolyte à fonctions acides déplace le pH optimum vers l'alcalinité et celui d'un support à fonctions alcalines le déplace vers l'acidité. Ceci peut être important car l'industrie cherche à minimiser les corrections de pH du substrat. La stabilité de ces produits varie aussi selon la nature du support, et il est déjà possible d'obtenir des produits d'excellente stabilité industrielle.

LES ENZYMES INSOLUBILISÉES

La littérature a cité des exemples d'insolubilisation d'amylase, mais nous ne pensons pas qu'une amylase insoluble puisse rendre des services à l'industrie. En effet, l'insolubilisation des enzymes diminue leur affinité pour les substrats à très haut poids moléculaire. De plus, on ne voit pas comment mettre en contact un empois d'amidon très visqueux avec un produit sous forme de grains. Enfin, l'amidon n'est pas une substance pure et la liquéfaction laisse en suspension un résidu de protéines coagulables qui ne manquerait pas de colmater rapidement les enzymes.

Par contre, l'amyloglucosidase semble être un produit de choix pour cette technique. On peut la faire agir sur une solution filtrée de maltodextrines, qui ne la salira pas. La technologie mise en œuvre pourra utiliser le passage de la solution, soit sur colonne d'enzyme, soit dans une cuve agitée contenant cette même enzyme, piégée par un filtre à la sortie. L'emploi de l'une ou l'autre technique ainsi que leur compa-

raison ont fait l'objet de nombreux développements mathématiques qui se basent malheureusement sur l'utilisation de faibles concentrations de substrat. Mais l'industrie fait fi des belles courbes et impose l'utilisation des solutions concentrées qu'elle traite habituellement (35 p. 100 de matières sèches). De ce fait, la fabrication industrielle du glucose par cette technique reste à résoudre.

Cependant, soyons assurés que cette technique sera bientôt utilisée à grande échelle et que l'insolubilisation des enzymes ouvrira de nouveaux débouchés dans des domaines où leur utilisation actuelle n'est pas rentable et convaincra les utilisateurs des possibilités toujours plus étendues de ces merveilleux outils.

SUMMARY

ENZYMES IN GLUCOSE MANUFACTURE

As this topic has already formed the subject of many lectures relating to processes and materials, we shall, by preference, study the characteristic properties of enzymes in the technological conditions of glucose manufacture, following the logical order of the processes.

As the action of amylases on crude starch is still too slow, enzymes must be made to react on the starch paste. The existing processes and materials amount to two types :

1. the starch suspension is rapidly brought to the temperature necessary for amylase action (Kroyer material, jet cooker), which leads to a violent increase in viscosity.
2. The slurry of crude starch is poured into a previously liquefied starch solution, which eliminates the viscosity peak but may augment gelification temperature.

Bacterial α-amylase is entirely adapted to starch liquefaction. Its high resistance to high temperatures is further improved by protection due to high substrate concentration. The liquefaction phenomenon is influenced by the presence of the calcium ion. The latter enlarges, appreciably, the pH zone in which the enzyme is active, and augments enzymatic activity so that final viscosity of the solution is lower. During industrial liquefaction, we followed the evolution of several parameters (viscosity, DE, iode colouring, remaining enzyme activity, filtration speed) in terms of pH, temperature and amount of amylase.

The paste of natural starch may contain modified compounds like retrograded starch and starch-fat complex. Retrograded starch is extremely inconvenient from the point of view of filtration ; it cannot be completely hydrolyzed by amylases and is difficult to demonstrate. The starch-fat complex is hydrolyzed slowly but none the less completely.

The maltodextrines made by bacterial amylase can be used as such, but are more generally used as intermediary products in the manufacture of more hydrolyzed syrups. Fungal or malt amylases give syrups with a high maltose content which are used in confectionery. With amyloglucosides, solution containing at least 95 p. 100 true glucose can be obtained in several days. In this case, acid preliquefaction can also be used, but the latter very readily causes the appearance of reversion products or isomerized products which decrease the final glucose yield. Laboratory use of amyloglucosidase which is purified and therefore totally free from transglucosidase seems to show that the hydrolysis reaction which it catalyzes could be reversible and therefore re-form diholosides from glucose.

By using an enzyme like glucose isomerase, a syrup containing considerable quantities of fructose can be obtained.

Finally, this industry is taking a great interest in enzyme insolubilization techniques as their use will not change the technology of syrup treatment in any way. The use of insoluble amylase for liquefaction is not justified as it will always be difficult to bring it into contact with starch paste. On the other hand, the maltodextrines, obtained by liquefaction with the help of amylase, which are easy to filter, are the ideal raw material for insoluble enzymes.

Amyloglucosidase and glucose isomerase are, at present, being given insolubilization treatment with the hope of providing industrial products *i. e.* providing an identical yield with an adequate life duration.

ZUSAMMENFASSUNG

ANWENDUNG VON ENZYMEN IN GLUKOSEFABRIKEN

Da dieses Problem bereits in vielen Kongressen behandelt wurde hinsichtlich der Verfahren und der Apparate, studieren wir in erster Linie die besonderen Enzymeigenschaften unter den technologischen Konditionen der Glukosefabrik, gemäss der logischen Ordnung der Verfahren.

Da diese Amylaseaktion auf die Rohstärke noch zu langsam ist, muss man die Enzyme auf die Stärke einwirken lassen. Die bestehenden Prozesse und Apparate lassen sich auf zwei Gruppen zurückführen :

1. Man bringt schnell den Stärkekleister auf Aktionstemperatur der Amylasen Apparate Kroyer, jet cooker), welche eine brutale Viscositätserhöhung bringt.
2. Man giesst die Rohstärkemilch in die schon verflüssigte Stärkelösung, welche die Viscositätsspitze ausscheidet, was jedoch die Gelatinierungstemperatur erhöhen kann.

Die bakterielle Alpha-Amylase ist vollständig an die Stärkeverflüssigung angepasst. Ihr starker Widerstand bei hoher Temperatur wird noch durch den Schutz seitens der hohen Substrat-Konzentration verbessert.

Das Verflüssigungsphänomen wird durch die Gegenwart des Kalcium-ions beeinflusst. Dieses verbreitert deutlich die pH-Zone, wo das Enzym aktiv ist und vermehrt die enzymatische Aktivität, so dass die Endviscosität der Lösung niedriger ist. Im Laufe der industriellen Verflüssigung, haben wir den Ablauf verschiedener Parameter (Viscosität, DE, Jodfärbung, restliche enzymatische Aktivität, Filtrationsgeschwindigkeit) in Abhängigkeit von pH, der Temperatur und der Amylasedosis verfolgt. Die Naturstärke kann modifizierte Verbindungen als rücklaufende Stärke und den Komplex Stärke/Fett enthalten. Die rücklaufende Stärke ist überaus schwierig hinsichtlich der Filtration. Sie wird nicht ganz durch die Amylasen hydrolisiert und ist schwer nachweisbar. Der Komplex Stärke/Fett wird langsam hydrolisiert, dennoch vollständig. Die durch die bakterielle Amylase hergestellten Maltodextrine können unverändert benutzt werden, sie sind jedoch meistens als Zwischenprodukte der Fabrikation von hydrolisierteren Sirupen benutzt. Die Amylase auf Pilzbasis oder die Malzamylase geben Sirupe mit hohem Gehalt an Maltose, die ihr Anwendung in der Konditorei finden. Die Amyloglukosidase ermöglicht, in einigen Tagen die Herstellung von Lösungen, die zumindest 95 p. 100 an reiner Glukose enthalten.

In diesem Fall kann man auch eine sauere Vorverflüssigung anwenden. Diese verursacht jedoch sehr leicht das Auftreten von Rückfall- oder isomerisierten Produkten, die die Glukoseausbeute am Ende vermindern. Der Gebrauch im Laboratorium der gereinigten Amyloglukosidase, die also völlig frei von Transglukosidase ist, scheint zu beweisen, dass die Hydrolysereaktion, die sie katalysiert, reversible sein könnte, und daher die Diholoside von der Glukose ausgehend wiederbildet.

Der Gebrauch eines Enzyms wie die Isomeraseglukose erlaubt, einen Sirup, der nennenswert Fruktosemengen enthält, zu erhalten.

Schliesslich interessiert sich diese Industrie sehr stark an Insolubilisierungstechniken für Enzyme, weil die Benutzung dieser Verfahren nichts an der Technologie der Sirupsbehandlung ändert. Der Gebrauch einer unlöslichen Amylase für die Verflüssigung vechtfertigt sich nicht, weil es immer schwer ist, dieselbe mit einem Stärkekleister in Berührung zu bringen.

Im Gegenteil sind die Maltodextrine, die durch die Verflüssigung mit Hilfe der Amylase erhalten wurden, leicht zu filtrieren. Sie stellen ideale Rohstoffe für Anwendung auf ünlöslicher Enzymkolonne dar.

Die Amyloglukosidase und die Glukose-Isomerase werden zurzeit einer Insolubisierungsaufbereitung unterzogen, wobei man hofft, industrielle Produkte zu erhalten, das heisst Produkte, die eine identische Ausbeute bei einer genügenden Lebensdauer gewähren.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Underkofler *et al.*, 1965. *Die Starke*, n° 6, p. 179.
(2) Nakamura *et al.*, 1964. *Internat. Chem. Eng.*, **4**, p. 530.
(3) Cayle *et al.*, 1966. *Cereal Chemistry*, **43**, n° 2, p. 237.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 287-296.

ZUR CHARAKTERISIERUNG VON GLUCOAMYLASE

H. RUTTLOFF

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Zentralinstitut für Ernährung Potsdam-Rehbrücke

ZUSAMMENFASSUNG

Glucoamylase (Amyloglucosidase, γ-Amylase, α-1,4-Glucan-Glucohydrolase) wird in zunehmendem Masse zur grosstechnischen Gewinnung von Traubenzucker aus Stärke herangezogen. Dieses Enzym wird in tierischen Geweben, vor allem jedoch in Mikroorganismen angetroffen und spaltet aus Stärke, Glykogen, Dextrinen sowie Gluco-Oligosacchariden Glucose vom nichtreduzierenden Kettenende her ab. Die Umsatzrate ist je nach Substrat unterschiedlich. Zur exakten Steuerung des industriellen Prozesses ist eine genaue Kenntnis der Eigenschaften von Glucoamylase erforderlich. In diesem Zusammenhang interessiert insbesondere die Anwesenheit von Begleitenzymen. Von Wichtigkeit ist der Gehalt an α-Amylase- und Transglucosidase-Aktivität sowie die Neigung zur « back-polymerization ». Auf die hierbei anstehende Problematik wird eingegangen, wobei auch Fragen der Analytik (insbesondere die Trennung Glucoamylase/α-Amylase) erörtert werden.

Seit einigen Jahren untersucht man des weiteren das Isoenzym-Muster von Glucoamylase-Präparaten, Im eigenen Arbeitskreis hierzu durchgeführte Arbeiten ergaben, dass Glucoamylase aus *Endomycopsis bispora* aus mehreren Isoenzymen besteht, deren Anteil an der Gesamtaktivität jedoch sehr unterschiedlich ist. Die Eigenschaften von 2 Isoenzymen werden mitgeteilt. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass eine gestaffelte Ausschüttung der einzelnen Isoenzyme im Verlaufe der Kulturführung erfolgt und dass am Ende derselben die Konzentration einer Komponente bei weitem überwiegt. Die gewonnenen Befunde werden diskutiert.

EINLEITUNG

Glucoamylase (Amyloglucosidase, Gluc-Amylase, γ-Amylase, α-1,4-Glucan-Glucohydrolase EC 3.2.1.3) wird bekanntlich zur grosstechnischen Gewinnung von Glucose eingesetzt. Sie spaltet aus Stärke (d.h. aus Amylose wie aus Amylopektin), aus Glykogen, Dextrinen sowie aus Glucooligosacchariden vom nichtreduzierenden Kettenende her Glucose ab und überführt diese Verbindungen nahezu quantitativ in das Monosaccharid (1). Das Enzym hydrolysiert die α-1,4-, die α-1,6- sowie die α-1,4-Bindung, wobei die erstgenannte Verknüpfung am raschesten zerlegt wird. Besonders ausgeprägt ist dieser Unterschied bei niedermolekularen Gliedern. Hoch-

molekulare Verbindungen (z.B. verkleisterte Stärke) werden rascher angegriffen als solche mit niedrigerem Molekulargewicht. Glucoamylase wird in verschiedenen tierischen Geweben vorgefunden (vgl. hierzu Abb. 1) (2-4). Hauptsächlich trifft man sie jedoch in Mikroorganismen an, von denen einige das Enzym mit grossen Ausbeuten produzieren. Hierher gehören vor allem die Pilzstämme aus den Gattungen *Aspergillus, Rhizopus* und *Endomycopsis* (5-7).

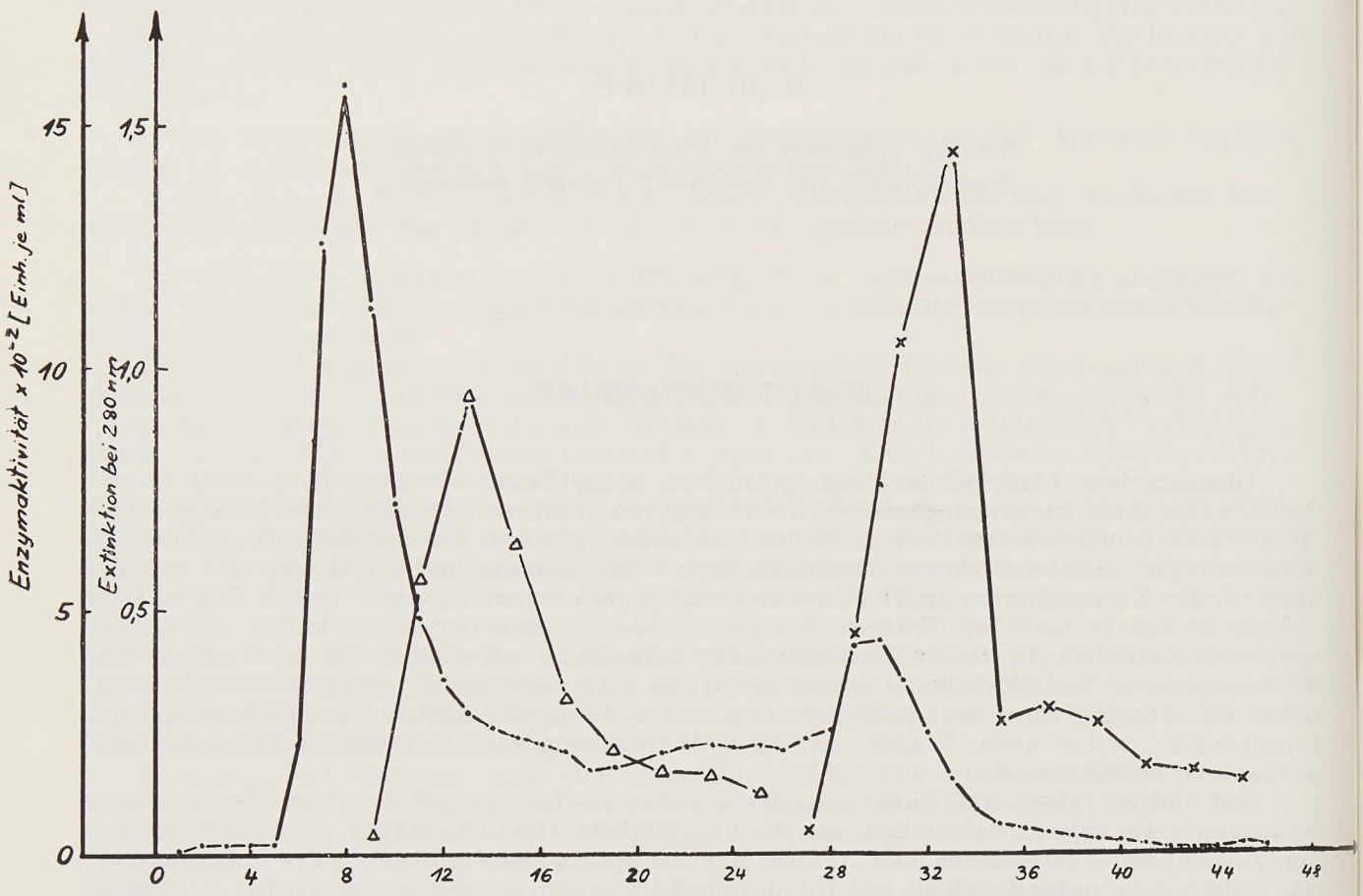


Abb. 1. — *Trennung der Amylasen aus der Mucosa des Schweinedarmes* (mit Papain in Lösung gebracht) *an Sephadex G 200* (4)

●——● Extinktion bei 280 nm
△——△ γ-Amylase
×——× α-Amylase

Die grosstechnische Produktion erfolgt submers, soweit Stämme der Gattungen *Aspergillus* und *Endomycopsis* zum Einsatz gelangen. *Rhizopus* wird zumeist emers kultiviert, wenngleich auch mit dieser Gattung Submersverfahren entwickelt worden sind. Die Zusammensetzung kommerzieller Präparate ist sehr unterschiedlich. An Begleitenzymen verdienen besondere Beachtung α-Amylase sowie Transglucosidase.

Die Einwirkung von α-Amylase auf das Substrat Stärke führt zur Bildung niedermolekularer Verbindungen, welch letztere durch Glucoamylase verlangsamt zerlegt werden. Die Anwesenheit α-amylolytischer Aktivitäten in grösserem Umfang ist daher nicht erwünscht. Transglucosidase überträgt Glucoseeinheiten von Maltose und anderen Glucooligosacchariden auf Glucose sowie auf andere Zucker (z.B. Maltose, Maltotriose, Isomaltose etc.). Die durch Transglucosidierung entstehen-

den Zucker werden von Glucoamylase nicht bzw. mit nur geringer Geschwindigkeit angegriffen, was Ausbeuteverluste bei der enzymatischen Glucosegewinnung zur Folge hat. Aus dem vorangehend Gesagten geht hervor, dass die Kombination α-Amylase/Transglucosidase besonders ungeeignet ist, da das stärkeabbauende Enzym die Substrate für die nachfolgende Transferierung liefert. Man ist daher bemüht, Transglucosidase entweder von vornherein bei der mikrobiellen Enzymbiosynthese auszuschliessen oder diese nachträglich durch spezielle Reinigungsoperationen zu entfernen (z.B. längerzeitiges Erhitzen bei erhöhtem bzw. erniedrigtem pH-Wert, Adsorption der Transglucosidase an Tonmineralien u.a. Verbindungen, säulenchromatographische Reinigung u.a.m.).

Sämtliche Glucoamylasen liefern durch « back-polymerization » Resyntheseprodukte, vorausgesetzt, dass die Glucosekonzentration genügend hoch ist (Abb. 2). Dieser Vorgang wird von Enzymen verschiedener Herkunft mit unterschiedlicher

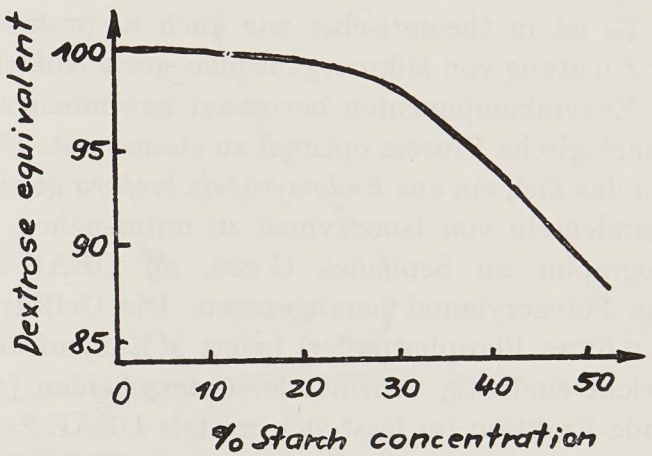


ABB. 2. — *Bei der Amyloglucosidase-Konversion von Stärke verschiedener Konzentration gebildete Dextrose-Äquivalente* (8)

Versuchsbedingungen : Enzymlösung mit 80 AGU von Diazym L 30 je pound Stärke ; pH 4,0 ; 60°C

Intensität katalysiert (6). Der Anteil an Resynthesezuckern in einem Stärkehydrolysat nimmt mit steigendem Konversionsgrad zu (8). Diese « back-polymerization » ist eindeutig von der Transglucosidasewirkung abzugrenzen (9). Erstere ist abhängig von der Glucosekonzentration, letztere hingegen nicht, und sie benötigt als Substrat Di- bzw. Oligosaccharide. Um den Resynthesevorgang bei der Glucosegewinnung möglichst niedrig zu halten, müssen die Konversionsdauer sowie die Verweilzeit des Enzyms nach erfolgter Hydrolyse möglichst kurz sein. Es empfiehlt sich, das Hydrolysat durch Hitzebehandlung von der noch vorhandenen Enzymaktivität rasch zu befreien.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität hat sich im internationalen Schrifttum die Glucoseoxydase/Peroxydase-Methode durchgesetzt (Ermittlung der durch Glucoamylase freigesetzten Glucose). Für Routinebestimmungen wird jedoch gewöhnlich ein reduktometrisches Verfahren (z.B. 3,5-Dinitrosalizylsäure) herangezogen. Ist α-Amylase anwesend, besteht zwischen den nach den beiden Verfahren gewonnenen Ergebnissen keine Übereinstimmung. Aus der Differenz kann man Rückschlüsse auf den Anteil an α-Amylase ziehen (10).

Aspergillus niger-Präparate erweisen sich als für die Verzuckerung sehr günstig

infolge ihrer grösseren Hitzeresistenz (höhere Verzuckerungstemperatur, Beschleunigung des Konversionsprozesses) und ihres niedrigen pH-Optimums (Verringerung der Gefahr des Wachstums von Mikroorganismen während der Inkubation). Des weiteren greifen sie α-1,6-Bindungen wirkungsvoller an, verglichen mit den Enzymen anderer Spezies. Von Nachteil ist ihre zumeist erhebliche Aktivität an α-Amylase, verbunden mit einer messbaren Transglucosidasewirkung. *Rhizopus*-Stämme synthetisieren nur wenig Transglucosidase. *Endomycopsis*-Präparate sind weitgehend frei von diesem Enzym wie auch von α-Amylase. Dafür ist die Hitzestabilität der Glucoamylase geringer als diejenige aus *A. niger*.

Für den Einsatz von Glucoamylasepräparaten bei lebensmitteltechnologischen Prozessen ist einmal die genaue Kenntnis der Begleitenzyme erforderlich (α-Amylase, Transglucosidase, Resynthesewirkung), zum anderen müssen die Eigenschaften des Glucoamylaseanteils bekannt sein. Nach Angaben der Literatur sowie nach eigenen Untersuchungen enthalten handelsübliche Glucoamylase-präparate mehrere Isoenzyme (11-12). Es ist in theoretischer wie auch in praktischer Hinsicht von Interesse, ob bei der Züchtung von Mikroorganismen sowie Aufarbeitung der Kulturlösungen diejenigen Enzymkomponenten bevorzugt gewonnen werden können, mit deren Hilfe der technologische Prozess optimal zu steuern ist. Eigene Untersuchungen hierzu verfolgten das Ziel, ein aus *Endomycopsis bispora* gewonnenes Enzympräparat auf das Vorhandensein von Isoenzymen zu untersuchen. Es wurden hierfür die Säulenchromatographie an Sephadex G 200, an DEAE-Zellulose sowie die Gelelektrophorese an Polyacrylamid herangezogen. Die Gelfiltration an Sephadex G 200 (Elution mit 0,01 m Phosphatpuffer) liefert 2 Enzymfraktionen, die sich in ihrem Molekulargewicht eindeutig voneinander unterscheiden (Abb. 3). Die zuerst im Eluat erscheinende Fraktion (*a*) lässt sich mittels DEAE-Zellulose nicht weiter auftrennen (sie wird im folgenden als Glucoamylase III bezeichnet), die zuletzt eluierte (*b*) kann gemäss Abb. 4 durch nachfolgende Chromatographie an DEAE-Zellulose weiter in 2 Isoenzyme zerlegt werden (die beiden Komponenten werden im folgenden als Glucoamylase I und II bezeichnet). Die Auftrennung mittels DEAE-Zellulose führt ebenfalls zur Sichtbarmachung von 2 Peaks. Durch Rechromatographie derselben an Sephadex G 200 lässt sich der mit DEAE-Zellulose im Eluat erscheinende Peak (*a*) in 2 Unterfraktionen zerlegen, es handelt sich um die Isoenzyme I und III. Der Peak (*b*) lässt sich mit G 200 nicht weiter auftrennen ; die Fraktion enthält die Komponente II. Sephadex G 200 bewirkt somit eine Auftrennung in die Fraktionen III sowie I + II (Gemisch), DEAE-Zellulose eine solche in Glucoamylase II sowie I + III (Gemisch). Durch Kombination beider Techniken gelingt es, die 3 Isoenzyme zu isolieren und quantitativ zu bestimmen (Abb. 5).

Auch gelelektrophoretisch lassen sich mehrere Isoenzyme nachweisen (13). Bei Chromatographie an Polyacrylamid-Gelstäbchen erhält man die Komponenten I und II, d.h. die gleiche Verteilung wie mit DEAE-Zellulose. Bei Trennung an Polyacrylamidgel-Platten lassen sich die Komponenten I und II in weitere Subfraktionen unterteilen. Insgesamt lassen sich etwa 6-Glucoamylase-Isoenzyme nachweisen.

Verfolgt man die Enzymausschüttung im Verlaufe des Wachstums, dann stellt sich gemäss Abb. 6 folgender Befund dar : Der messbare Abbau der Stärke beginnt in der späten logarithmischen Phase und erfolgt hauptsächlich in der Übergangsphase.

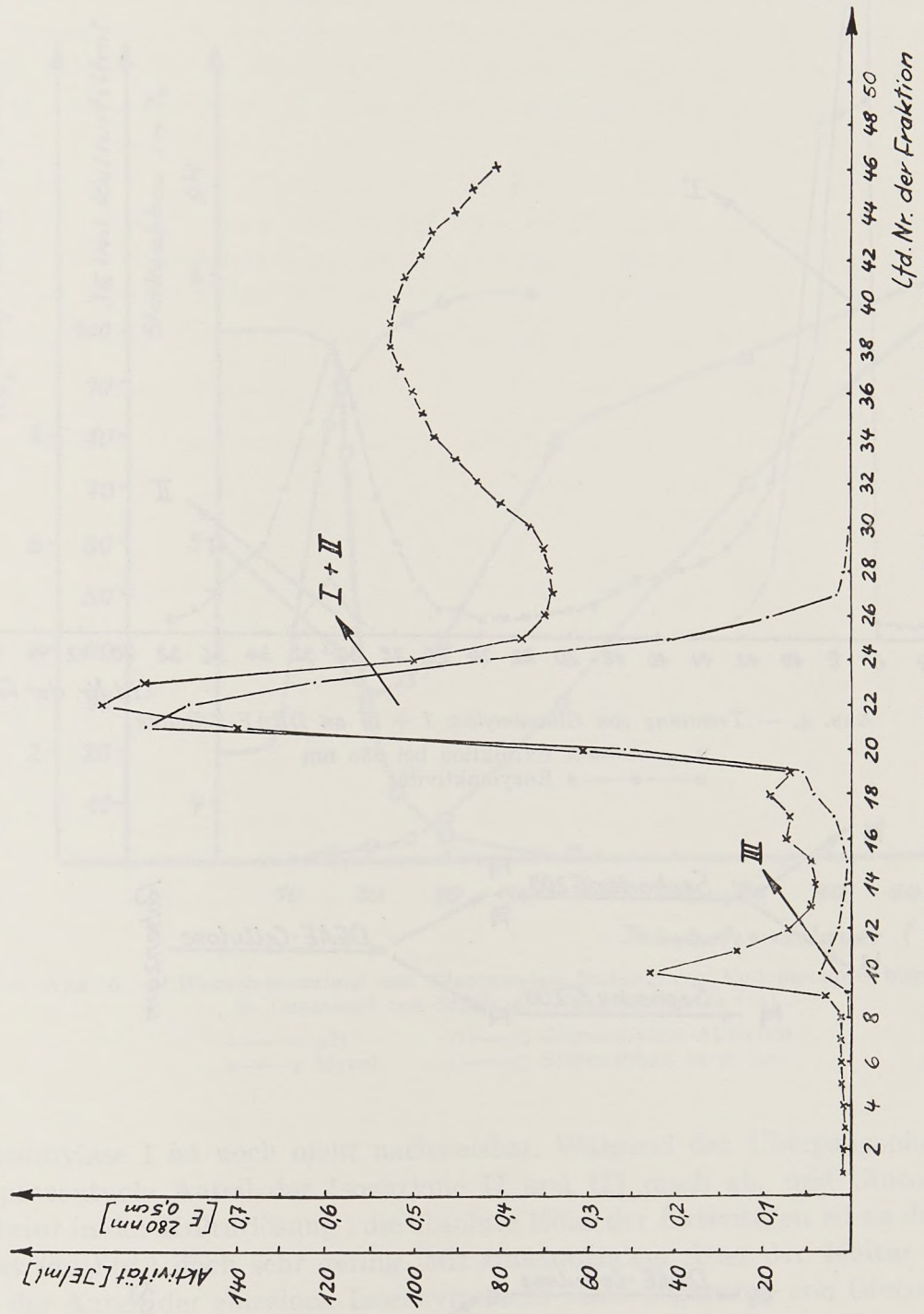


ABB. 3. — *Fraktionierung von Glucoamylase-Rohenzym an Sephadex G 200*
×——×——× Extinktion bei 280 nm
●——●——● Enzymaktivität

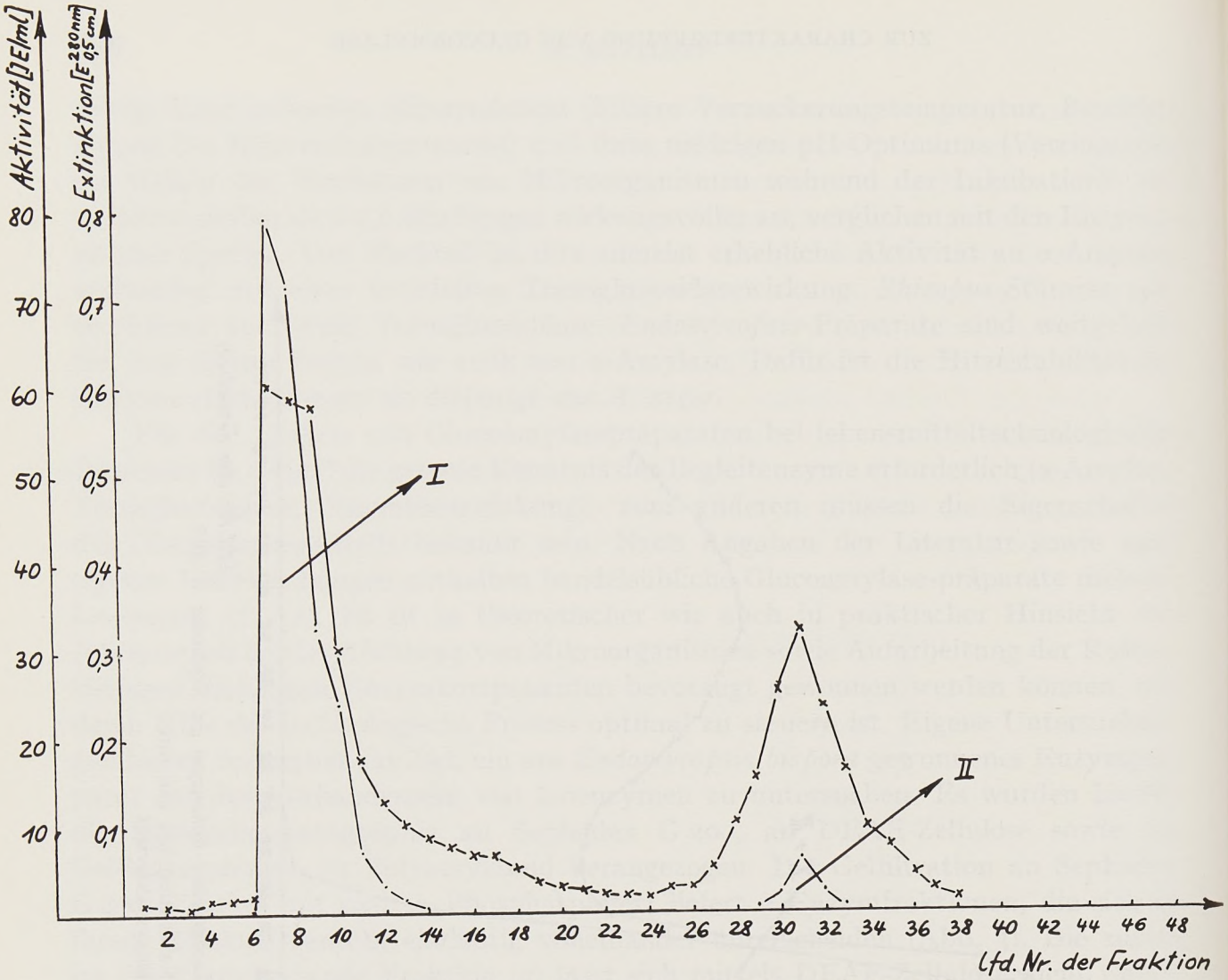
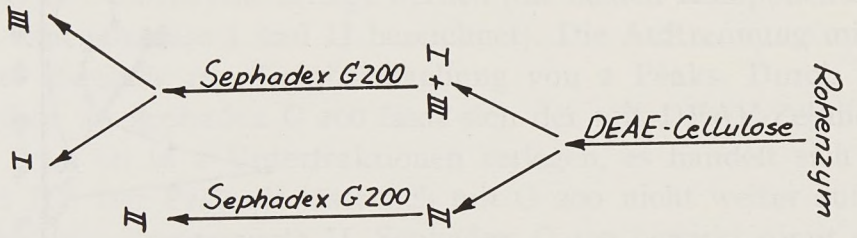


Abb. 4. — *Trennung von Glucoamylase I + II an DEAE-Zellulose*

×——×——× Extinktion bei 280 nm
●——●——● Enzymaktivität



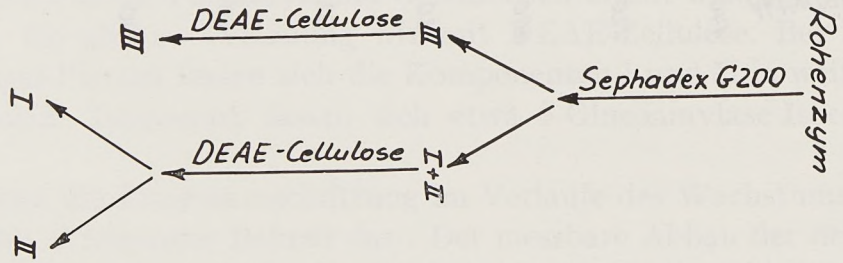


Abb. 5. — *Schematische Darstellung einer säulenchromatographischen Fraktionierung von Glucoamylaserohenzym*

Nach 30 bis 40 Std. ist die Stärke praktisch quantitativ umgesetzt. Zum gleichen Zeitpunkt beginnt die Ausschüttung der Glucoamylase in die Kulturlösung. Die Verteilung der Isoenzyme I bis II im Kulturmedium ist im Verlaufe der Kulturführung sehr unterschiedlich. Am Ende der log-Phase werden 81 p. 100 der Gesamtglucoamylase-Aktivität als Komponente III, 19 p. 100 als Komponente II ermittelt;

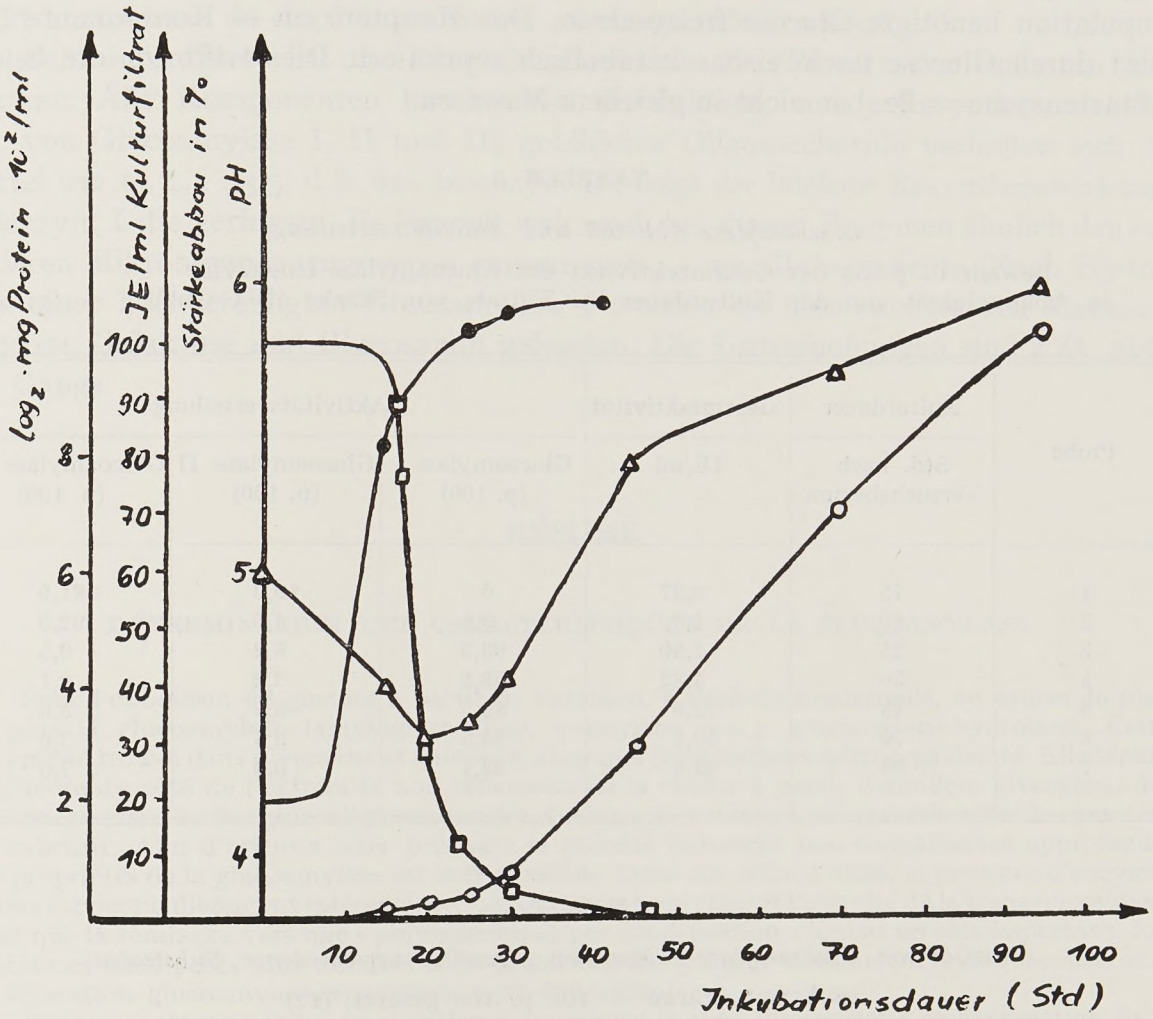


Abb. 6. — *Wachstumsverlauf und Glucoamylase-Bildung* von Endomycopsis bispora *in Gegenwart von Stärke als Kohlenstoffquelle* (11)

△——△ pH ○——○ Glucoamylase-Aktivitöt
●——● Mycel □——□ Stärkeabbau in p. 100

Glucoamylase I ist noch nicht nachweisbar. Während der Übergangsphase nimmt der prozentuale Anteil der Isoenzyme II und III rasch ab, und Glucoamylase I erscheint in der Kulturlösung; die absolute Höhe der Aktivitäten ist zu diesem Zeitpunkt (20 Std.) noch sehr gering. Mit zunehmendem Alter der Kultur verschiebt sich der Anteil der einzelnen Isoenzyme sehr rasch zugunsten von Glucoamylase I. Die Gesamtaktivität ist bei Versuchsende zu über 90 p. 100 diesem Enzym zuzuordnen (Tab. 1).

Der Anteil der zellgebundenen Glucoamylase während der log-Phase beträgt nur 0,17 IE je g Biomasse. Er ist somit — verglichen mit der in das Medium ausgeschütteten Enzymmenge — sehr gering, denn 1 g Myzel gibt zu gleicher Zeit 6,7 IE an das Medium ab.

Komponente III dominiert somit während des logarithmischen Wachstums. Offenbar dient diese dem Stärkeabbau im Medium und stellt somit das für Wachstum und Entwicklung des Stammes und seinen Stoffwechsel entscheidende polysaccharidspaltende Enzym dar. Ähnlich verhält sich Isoenzym II. Die am Anfang verhältnismässig geringe Aktivität dieser beiden Komponenten von zusammen 0,37 IE je ml Kulturlösung reicht aus, um die für den Stoffwechsel der wachsenden Population benötigte Glucose freizusetzen. Das Hauptenzym — Komponente I — wird durch Glucose nachweisbar katabolisch reprimiert. Dies trifft für die beiden « Startenzyme » offenbar nicht in gleichem Masse zu.

TABELLE 1

Glucoamylase-Aktivität und Aktivitätsverteilung

(jeweils in p.100 der Gesamtaktivität der Glucoamylase-Isoenzyme in Abhängigkeit von der Kulturdauer bei Einsatz von Stärke als C-Quelle) (11)

Probe	Kulturdauer	Gesamtaktivität	Aktivitätsverteilung		
	Std. nach Versuchsbeginn	IE/ml	Glucoamylase I (p. 100)	Glucoamylase II (p. 100)	Glucoamylase III (p. 100)
1	15	0,37	0	19,0	81,0
2	20	1,0	3,5	4,5	92,0
3	25	1,90	93,3	6,2	0,5
4	30	4,82	96,6	3,3	0,1
5	45	23,9	89,0	3,0	8,0
6	70	50,5	93,5	3,5	3,0
7	95	92,6	92,1	0,9	7,0

TABELLE 2

Aktivität von Glucoamylase-Präparaten gegenüber verschiedenen Substraten

(Substrat Stärke = 100 p. 100 gesetzt) (12)

Substrat	Glucoamylase I	Glucoamylase II	Kulturfiltrat
Stärke	100	100	100
Maltose	17,9	25,3	16,8
Maltotriose	51,4	62,1	54,1
Isomaltose	1,8	0,8	1,5
Isomaltotriose ..	0,8	0,7	0,7
Glykogen	16,6	5,6	15,2
Dextran	0	0	0

Hinsichtlich pH- und Temperaturverhalten differieren die gefundenen Isoenzyme nur wenig. Die Substratspezifität geht aus Tab. 2 hervor. Hier werden Unterschiede beobachtet. Stets verringert sich bei Substraten mit α-1,4-Bindung die Spaltungsrate mit Abnahme der Kettenlänge. Es ist aus diesem Grunde auch unver-

ständlich, dass verschiedentlich Maltose als Substrat für die Bestimmung der Glucoamylaseaktivität herangezogen wird. Umgekehrt ist es bei Substraten mit α-1,6-Bindung. Isomaltose wird rascher zerlegt als Isomaltotriose ; bei Dextran lässt sich in keinem Falle eine Spaltung nachweisen.

Das Molekulargewicht von Glucoamylase I und II wurde mit jeweils etwa 50 000 ermittelt (Gelfiltration G 200). Für das Isoenzym III ist ein weit höherer Wert anzusetzen, da das Enzym von G 200 ausgeschlossen wird.

Sehr interessant ist das Resyntheseverhalten bei Einsatz der isolierten Isoenzyme. Alle Komponenten katalysieren die Bildung von 3 Resynthesezuckern. Die von Glucoamylase I, II und III gebildeten Oligosaccharide verhalten sich im Mittel wie 1 : 1,3 : 3,3, d.h. das Isoenzym III zeigt die höchste Resynthesewirkung, Isoenzym I die geringste. Es handelt sich auch bei diesen Enzymen ähnlich den aus anderen Mikroorganismengruppen gewonnenen — um Glykoproteide. Nach Hydrolyse einer hochgereinigten Glucoamylase I wurden an Monosacchariden Mannose, Glucose, Galaktose und Glucosamin gefunden. Die Untersuchungen sind z.Zt. noch im Gange.

RÉSUMÉ

DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE LA GLUCOAMYLASE

Pour l'obtention du glucose à partir de l'amidon, à l'échelle industrielle, on utilise de plus en plus la glucoamylase (amyloglucosidase, γ-amylase, α-1,4, glucan-gluco-hydrolase). Cette enzyme se trouve dans divers tissus animaux, ainsi que dans certains microorganismes. Elle sépare le glucose du côté de l'extrémité non réductrice de la chaîne à partir d'amidon, glycogène, des dextrines ainsi que des glucooligosaccharides. Le taux de transfert est variable selon le caractère du substrat. Afin d'orienter avec précision le procédé industriel une connaissance approfondie des propriétés de la glucoamylase est indispensable. Dans cet ordre d'idées, la présence d'enzymes autres est particulièrement intéressante. La teneur en α-amylase et l'activité de la transglucosidase, ainsi que la tendance vers une « polymérisation par condensation » jouent un rôle important. Les problèmes ainsi posés sont discutés et les problèmes analytiques, notamment ceux qui concernent la séparation glucoamylase/α-amylase, sont énumérés.

Depuis quelques années on a également examiné le type d'isoenzyme de préparation de la glucoamylase. Notre équipe a pu constater, au cours de travaux originaux, que la glucoamylase de *Endomycopsis bispora* est constituée par plusieurs isoenzymes, dont la participation à l'activité totale est cependant très différente. Les caractéristiques de deux isoenzymes sont présentées dans cette communication. Nous avons en outre pu observer une distribution étagée des différentes isoenzymes au cours de l'évolution de la culture et, à la fin, la concentration d'une composante qui est de loin prépondérante. Les résultats obtenus sont examinés en les discutant.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF GLUCOAMYLASE

In order to obtain glucose from starch, on an industrial scale, glucoamylase (amyloglucosidase, γ-amylase, α-1.4, glucan-gluco-hydrolase) is used more and more often. This enzyme is found in various animal tissues, as well as in some micro-organisms. It separates the glucose of the side of the non reductory end of the chain from starch, glycogen, dextrines and gluco-oligosaccharides. The rate of transfer varies according to the characteristic of the substrate. In order

to accurately orientate the industrial process a thorough knowledge of the properties of glucoamylase is absolutely necessary. Following from this, the presence of other enzymes is particularly interesting. α-amylase content and transglucosidase activity, as well as the tendency to « polymerization by condensation » play an important role. The problems thus put forward are discussed and the analytic problems, notably those concerning glucoamylase/α-amylase separation are enumerated.

For several years, the glucoamylase preparation isoenzyme has been examined. Our team has been able to establish, in the course of research work, that the glucoamylase of *Endomycopsis bispora*, is made up of several isoenzymes, whose participation in the total activity, is, however, very different. The characteristics of two isoenzymes are presented in this paper. We have, moreover, been able to observe a staggered distribution of the different enzymes during the evolution of the culture, and, finally, the concentration of a constituant part which is by far preponderant. The results obtained are discussed and examined.

LITERATUR

(1) Pazur J. H., 1962. *Methods Carbohydrate Chem.*, **4**, 266.
(2) Rosenfeld E. L., 1959. *Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R.* **128**, 1298.
(3) Ruttloff H., Friese R., Täufel K., 1967. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, **348**, 705.
(4) Ruttloff H., Täufel K., 1968. *Nahrung*, **12**, 523.
(5) Lineback D. R., 1968. *Carbohydrate Res.*, **7**, 106.
(6) Pazur J. H., Okada S., 1967. *Carbohydrate Res.*, **4**, 371.
(7) Hattori Y., 1961. *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 737.
(8) Underkofler L. A., Denault L. J., Hou E. F., 1965. *Stärke*, **27**, 179.
(9) Täufel A., Ruttloff H., Täufel K., 1969. *Nahrung*, **13**, 163.
(10) Ruttoff H., Friese R., Richter M., 1970. *Z. allg. Mikrobiol.*, **10**, 341.
(11) Ruttloff H., Täufel A., Friese R., Zickler F., 1970. *Z. allg. Mikrobiol.*, **10**, 335.
(12) Ruttloff H., Friese R., Kupke G., Täufel A., 1969. *Z. allg. Mikrobiol.*, **9**, 39.
(13) Kupke G., Ruttloff H., 1967. *Nahrung*, **11**, 733.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 297-319.

ASPECTS SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES FONDAMENTAUX DU BRASSAGE ENZYMATIQUE

J. HOLLÓ, E. LÁSZLÓ et M. TÓTH

Université technique,
Gellért Tér 4
1511 Budapest (Hongrie)

RÉSUMÉ

Les phases les plus importantes du brassage sont la dégradation enzymatique des polymères de l'orge et du malt, ainsi que la conversion des produits obtenus par fermentation. Au cours de la sélection des enzymes protéolytiques industriels, les optima de pH et de température de la préparation enzymatique doivent être pris en considération, ainsi que la teneur en exo- et endo-peptidases de la préparation, de même que le développement du mode d'action de ceux-ci dans les différentes conditions de la mise en trempe. L'action protéolytique a été suivie par précipitation trichloracétique fractionnée, c'est-à-dire par l'emploi d'un titrage turbidimétrique, en employant l'acide trichloracétique.

La préparation amylolytique industrielle doit contenir de l'alpha-amylase, étant donné que cette enzyme ne se trouve pas dans l'orge. L'amylase alpha doit avoir un optimum thermique élevé, étant donné que la décomposition de l'orge s'accomplit avec plus de difficulté que celle du malt, celui-ci ayant subi une certaine « pré-dégradation » au cours de la germination. En dehors de cela, l'influence conjuguée de la bêta-amylase de l'orge et de la composante amylase alpha dans la préparation d'enzyme industrielle doit être réglée de sorte qu'une distribution appropriée des produits puisse être obtenue. Pour suivre l'action des deux enzymes mentionnées, une méthode photométrique, mettant en œuvre une titration iodométrique a été utilisée.

Les enzymes ayant une action décomposante sur les autres polyoses exercent déjà leur action principale pendant le maltage. Cependant, quand il s'agit de la mise en trempe de l'orge, on doit en prendre soin séparément. Cela peut se faire soit par l'emploi d'une préparation d'enzyme industrielle appropriée, ou bien par le dosage d'une quantité modérée de malt. La marche du processus a été suivie par une méthode de précipitation alcoolique.

En suivant les processus de dégradation des polymères et par leur régulation, la protéase neutre obtenue à partir de *Bacillus subtilis*, c'est-à-dire l'amylase alpha, présentant une tolérance élevée à l'égard des températures élevées, a été reconnue comme susceptible de remplacer les enzymes correspondantes du malt.

INTRODUCTION

Il est généralement admis que les enzymes jouent un rôle prépondérant dans toutes les phrases du brassage. La source classique d'enzyme du brasseur est l'orge maltée, dont la teneur en enzyme riche et à spectre large permet plusieurs types de brassage grâce à l'emploi des procédés de brassage les plus divers, même dans le cas où on ne considère pas les caractéristiques possibles à développer à l'aide des variantes de maltage.

Dans plusieurs pays, on utilise aussi des substituts dans le brassage. La capacité enzymatique du malt est supérieure à celle qui est nécessaire à la décomposition de son propre extrait ; il est alors capable de décomposer une quantité limitée de la matière employée comme ersatz. Ainsi en Europe et en Amérique du Nord, on ajoute 25-40 p. 100 de maïs ou du riz, en République démocratique allemande de 25 p. 100 d'orge (1, 2).

Dans bon nombre de pays on utilise des succédanés lors du brassage. L'emploi de ceux-ci exige un pouvoir enzymatique élevé du malt mis en œuvre, afin de provoquer la décomposition de ces succédanés et avec un remplacement important du malt, un apport d'enzyme de source extérieure est indispensable. Quand à cette source d'enzyme extérieure, elle doit être non seulement de prix modique, mais sa composition et son mécanisme de décomposition devront être adéquats.

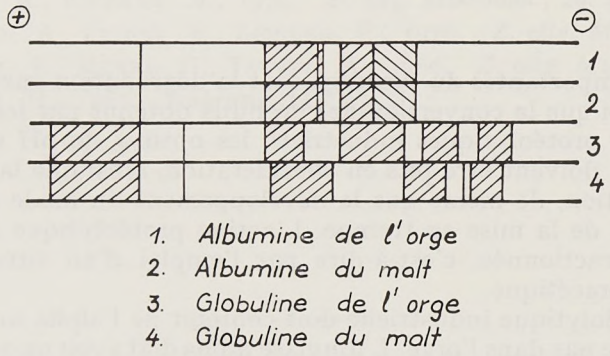


FIG. 1. — *Électrophorégramme des protéines de l'orge*

Les cinq groupes importants d'enzymes utilisées dans le brassage se trouvent dans le malt, ce sont des amylases, protéases, phosphatase, des enzymes cellulolytiques ainsi que des enzymes transformant les lipides.

Le succédané le plus naturel du malt est l'orge qui contient une partie des enzymes du brassage à l'état latent et l'autre partie en état plus ou moins actif.

La teneur en bêta-amylase active de l'orge est très importante, mais du point de vue du brassage on doit également prendre en considération une certaine activité des cytases, phosphatases, oligases et protéases (3, 4).

En tant que succédané, l'orge présente un grand avantage : celui qu'en dehors de sa richesse en hydrates de carbone, il contient des protéines s'accordant naturellement avec celles du malt, ce qui a été prouvé par électrophorèse (LATIMER et coll., 1966) (fig. 1).

Pour l'emploi parallèle du malt et de l'orge à la limite de certains remplace-

ments, le pouvoir enzymatique du malt permet également la dégradation des constituants de l'orge, mais pour un remplacement important de 60 à 80 p. 100 le pouvoir enzymatique du malt doit être complété par une addition d'enzyme exogène, notamment par de l'alpha-amylase et une protéase.

En 1966, LATIMER et ses collaborateurs ont réussi plusieurs brassages avec de l'enzyme d'orge (5), on connaît également des expériences de chercheurs anglais (6), allemands (7-10), hollandais (3, 11-14).

Les chercheurs de l'Union soviétique (15) et de la Pologne (16) ont fait des essais d'emploi de maïs et d'amylase de moisissures mais ni eux, ni les chercheurs cités ci-dessus n'ont employé dans le brassage industriel une fraction de matière de remplacement supérieure de 50 p. 100.

CARACTÉRISTIQUES D'UNE PRÉPARATION POUR BRASSAGE ENZYMATIQUE

Après des années d'expérience du laboratoire et à l'échelon industriel, nous avons mis au point en coopération avec la firme hollandaise Naarden, une préparation enzymatique, le « Brew-n-zym » dont l'emploi a rendu possible le brassage industriel dans le cas d'une fraction très importante de matière de remplacement (17-24).

Dans ce but, il fallait résoudre plusieurs problèmes d'analyse, concernant la mouture et la filtration (25-29). Actuellement plusieurs brasseries hongroises ont déjà adopté la méthode enzymatique.

Parmi les enzymes utilisées au cours du brassage, les alpha-amylases et des protéases peuvent être facilement obtenues par des cultures microbiennes, par exemple *B. subtilis B. stearothermophilus, Asp. oryzae.*

Les alpha-amylases et les protéases s'obtiennent relativement aisément et à prix modique par fermentation microbienne par exemple de *Bacillus stearothermophilus,* et d'*Aspergillus oryzae.* Au cours de l'incubation, le microorganisme produit simultanément des protéases et de l'alpha-amylase, le rapport des deux groupes d'enzymes pouvant être réglé en fonction de la composition du moût de fermentation et des conditions de la reproduction. Ce même rapport peut être conservé lors de l'épuration et de la transformation du moût de fermentation. D'après notre expérience, la teneur en enzymes diverses du malt (20 à 30 p. 100), de l'orge et par exemple de Brew-n-zyme sont suffisantes pour effectuer des décompositions diverses, autres que celles de protéolyse et de alpha-amylolyse, — décompositions qui sont satisfaisantes pour la technologie du brassage.

D'ailleurs chaque préparation d'enzyme peut être librement complétée par des enzymes cytolytiques, phosphorolytiques ou d'autres.

On est naturellement conduit à se demander si les enzymes de malt et celles des microbes sont identiques, si leur composition et leurs caractéristiques sont analogues. Bien entendu, la réponse est négative. Comme le tableau 1 l'indique, leur constitution leur optimum de pH et de température sont bien différentes, cependant ces facteurs peuvent être harmonisés par voie expérimentale avec la technologie de la brasserie

TABLEAU I

Constantes physiques de quelques α-amylases cristallisées

Nom	Malt	Pancréase de porc	Salive humaine	*Asp. oryzae*	*Bac. subt.*	*Bac. stearotherm.*	*Pseudomona saccharophila*
N %	13,4	15,9	17,0	14,9	16,0	15,0	—
Activité mg enzyme	315,0	630,0	980,0	310,0	500,0	—	5 700-6 000 *
pH opt.	4,0-5,8	6,0-6,8	6,9	4,8-5,8	6,0	5,0	5,25-5,75
Intervalle de stabilité	4,9-9,1	7,0-8,5	4,8-11,0	5,5-8,5	4,8-8,5	—	4,5-8,0
Solubilité % 2°C ; pH = 7,0	15,0	0,6	0,3	10,0	6,0	—	
Énergie d'activité	7 050	13 500	13 500	10 650	0-12° 15 000 12° 11 000	14 000	0-15° 14 4000 15-40° 8 500
Opt. de temp. (°C)	35	37	40	40	40	65	
Poids moléculaire	59 500	45 000	—	51 000	48 700	15 600	
Point isoélectrique	5,7	5,2-5,6	5,2-5,6	4,2	5,4	4,8	
Coeff. d'ext. 1 % ; 280 mμ	—	26	26	19,7	25,3	—	—

* Activité mg nitrogen.

sans que les équipements technologiques ou les caractéristiques principales de la technologie soient modifiés. Ajoutons encore que tant pendant le brassage que dans les caractéristiques ultérieures de la bière finie on ne constate pas d'écarts caractéristiques, ni de modification de certaines caractéristiques, comme par exemple la sensibilité au froid et la stabilité, — peuvent être corrigées.

Amylases

Prenons l'exemple des valeurs de pH et de température de l'alpha-amylase d'origine bactérienne et de celle du malt (fig. 2 et 3).

La figure 2 montre que le domaine de pH de l'alpha-amylase bactérienne est sensiblement plus large que celui de l'alpha-amylase de malt, de sorte que lors de

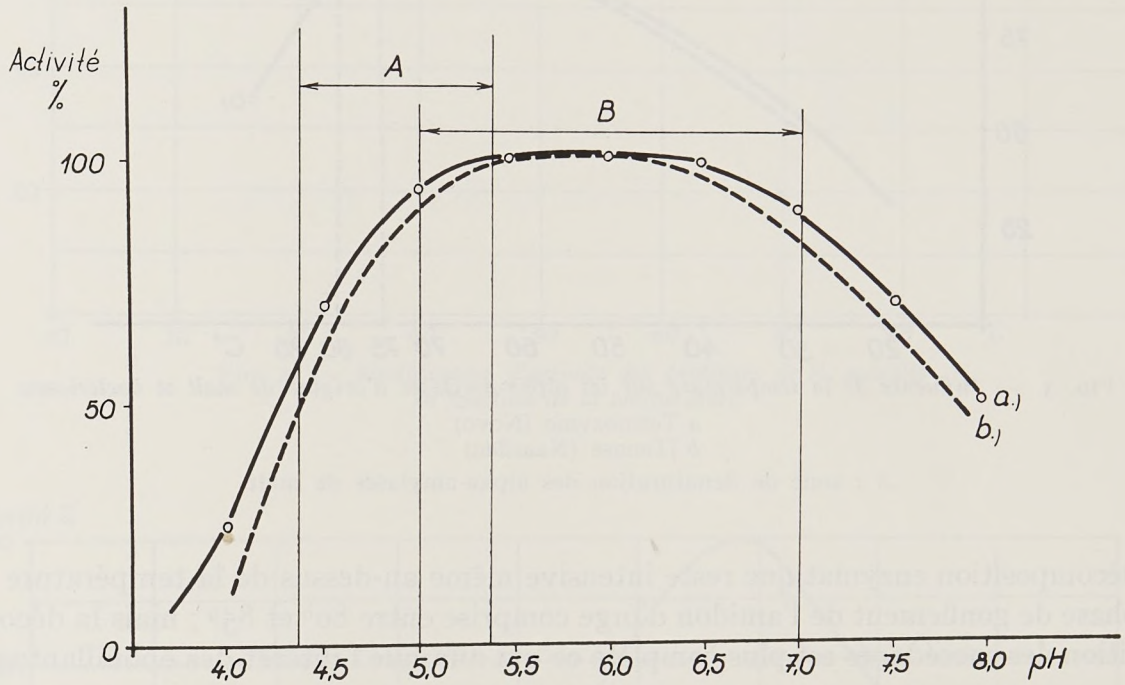


Fig. 2. — *Domaine d'activité de pH des amylases bactériennes du malt*

a) Tenase (Naarden)
b) Termozyme (Novo)

A : optima de pH des alpha-amylases d'origine : de malt
B : optima de pH des alpha-amylases d'origine *B. subtilis*

la mise en trempe il est inutile de contrôler ou éventuellement d'acidifier le moût, comme il serait nécessaire de le faire lors de la mise en trempe avec le malt. Or, le domaine d'action, de pH des alpha-amylases bactériennes peut être davantage élargi grâce au dosage des teneurs en Ca (des avantages supplémentaires sont encore présentés par exemple dans le cas de l'emploi d'eaux gypseuses).

Il est également intéressant d'étudier la résistance à la température des alpha-amylases de deux origines différentes. Les possibilités d'altération de l'alpha-amylase sont fréquentes, non seulement au cours du maltage, mais aussi pendant la mise en trempe par suite d'une manipulation incorrecte notamment lors de l'ébouillantage, l'activité alpha-amylasique du malt peut être et est souvent gravement atteinte.

Comme la figure 3 le montre, l'alpha-amylase d'origine bactérienne conserve plus de 50 p. 100 de son activité même au-dessus de 85°C et ne devient inactive que

lors de l'ébouillantage, mais elle n'est pas sensible aux faibles échauffements locaux, même à des températures de 85° à 90°C, qui sont fréquemment atteintes pendant la phase de décoction. Un autre avantage de la résistance thermique est le fait que

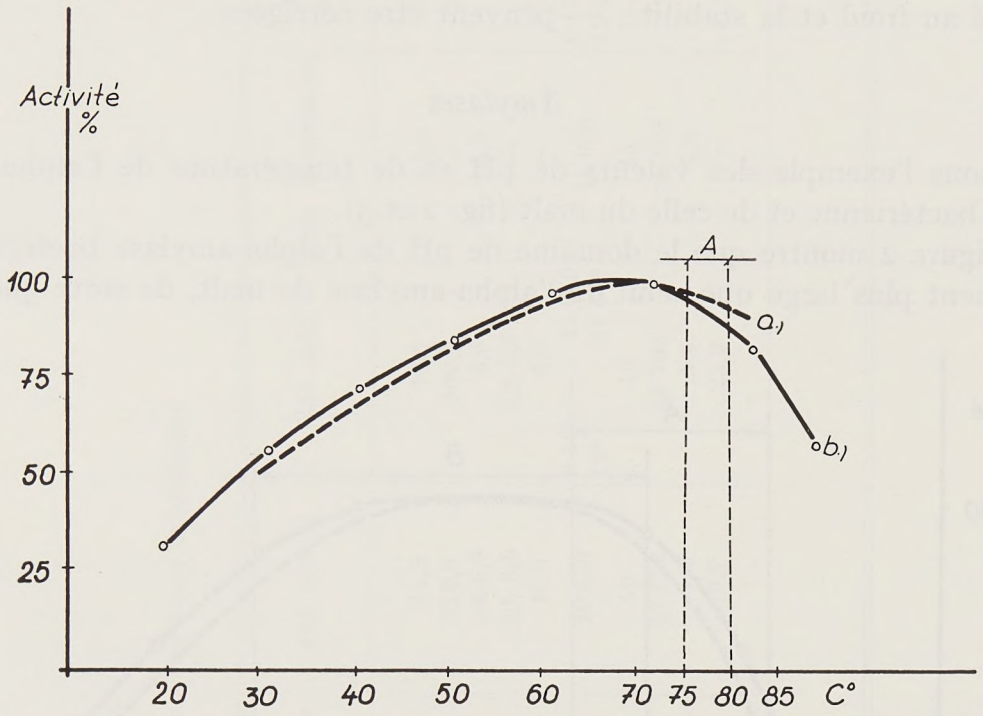


FIG. 3. — *Influence de la température sur les alpha-amylases d'origine de malt et bactérienne*
a Termozyme (Novo)
b)Tenase (Naarden)
A : zone de dénaturation des alpha-amylases de malt

la décomposition enzymatique reste intensive même au-dessus de la température de la phase de gonflement de l'amidon d'orge comprise entre 80° et 85° ; mais la décomposition des succédanés est plus complète ce qui diminue l'intérêt des ébouillantages.

Protéases

Les optima de pH des enzymes protéolytiques du malt s'échelonnent entre 4,3 et 4,6 pour les protéinases et de 7,8 à 8,6 pour les peptidases. La température optimale dans les deux cas est de l'ordre de 45 à 50°C. La comparaison avec la protéase produite par le *B. subtilis* (fig. 4) montre bien que la protéase bactérienne s'utilise bien à la température de repos conventionnelle de la protéine, et en même temps, étant donné la résistance thermique plus grande, il convient de prévoir une activité protéolytique à une température plus élevée.

On admet que les domaines de pH d'activité des deux protéases se recouvrent bien (fig. 5). Nous avons étudié aussi dans les conditions du laboratoire la relation du pH et de la température de la protéolyse avec un moût de malt pur. A partir des échantillons nous avons mesuré la teneur en azote total, dosé par le formol, ainsi que de la répartition suivant le poids moléculaire à l'aide de fractionnement TCA comparativement aux fractions de Lundin.

L'évolution de la teneur en azote dissoute est portée sur la figure 6. Ceci permet de constater que pour une valeur de pH de 4,9 et de 5,6, plus défavorables pour la

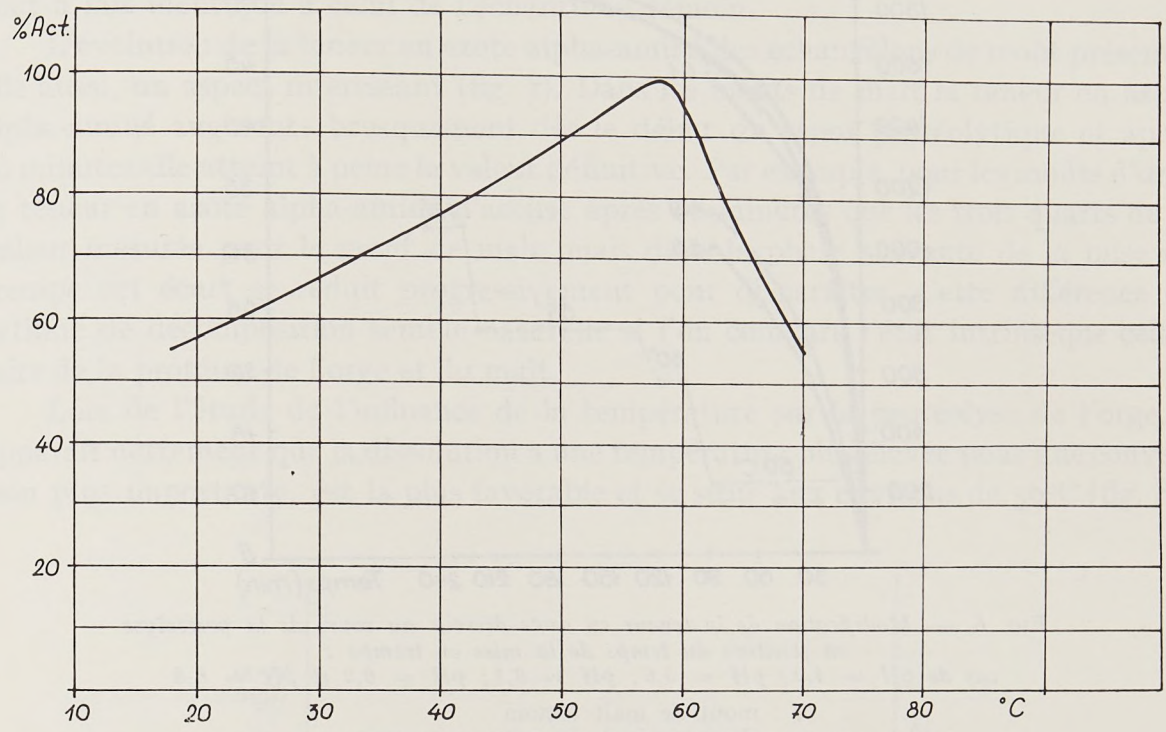


FIG. 4. — *Modification d'activité des protéases de* B. subtilis *en fonction de la température*

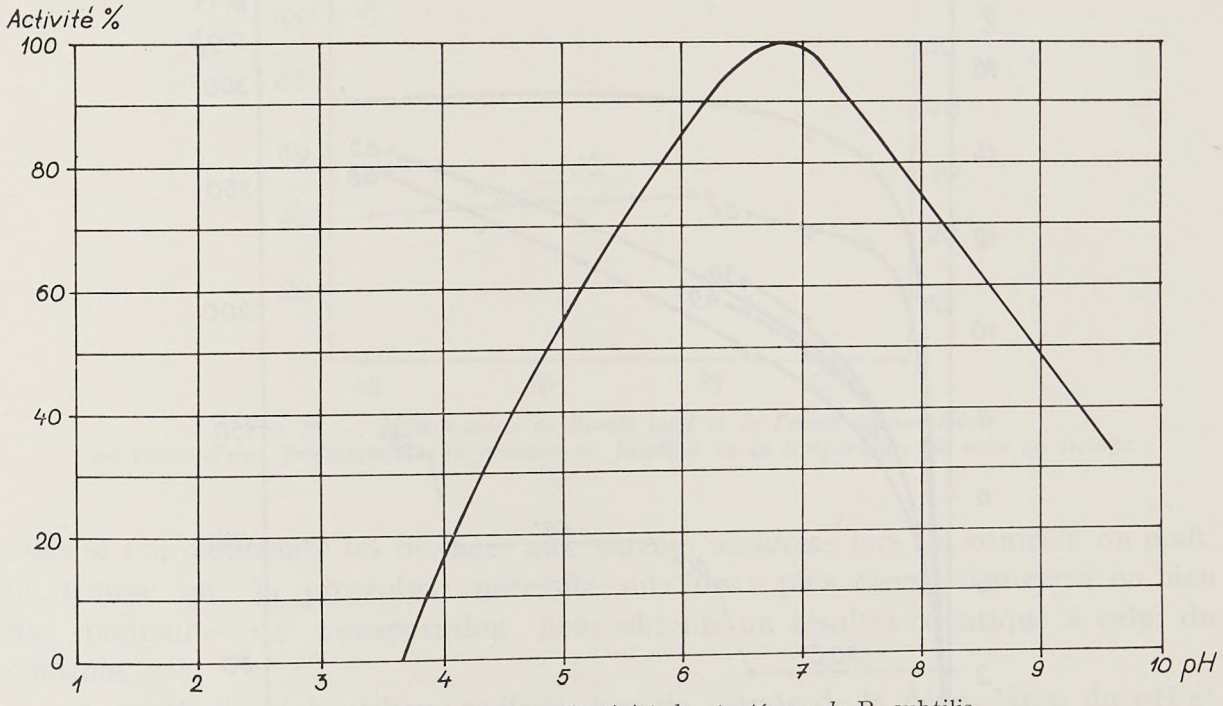


FIG. 5. — *Modification d'activité des protéases de* B. subtilis *en fonction du pH*

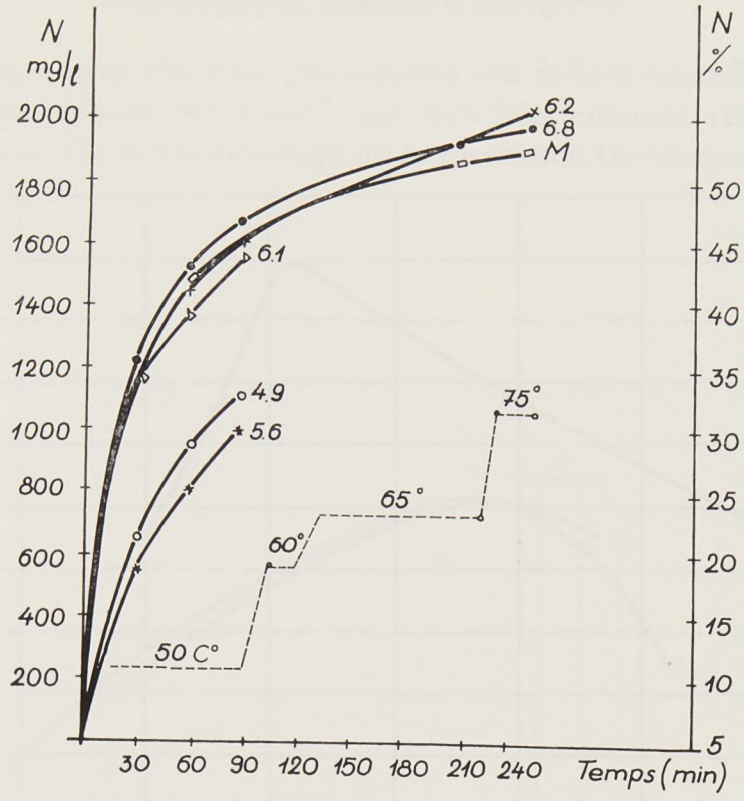


FIG. 6. — *Modification de la teneur en azote dissous au cours de la protéolyse en fonction du temps de la mise en trempe : cas de pH = 4,9 ; pH = 5,6 ; pH = 6,1 ; pH = 6,2 et pH = 6,8*

M : moût de malt témoin
---- diagramme de la mise en trempe

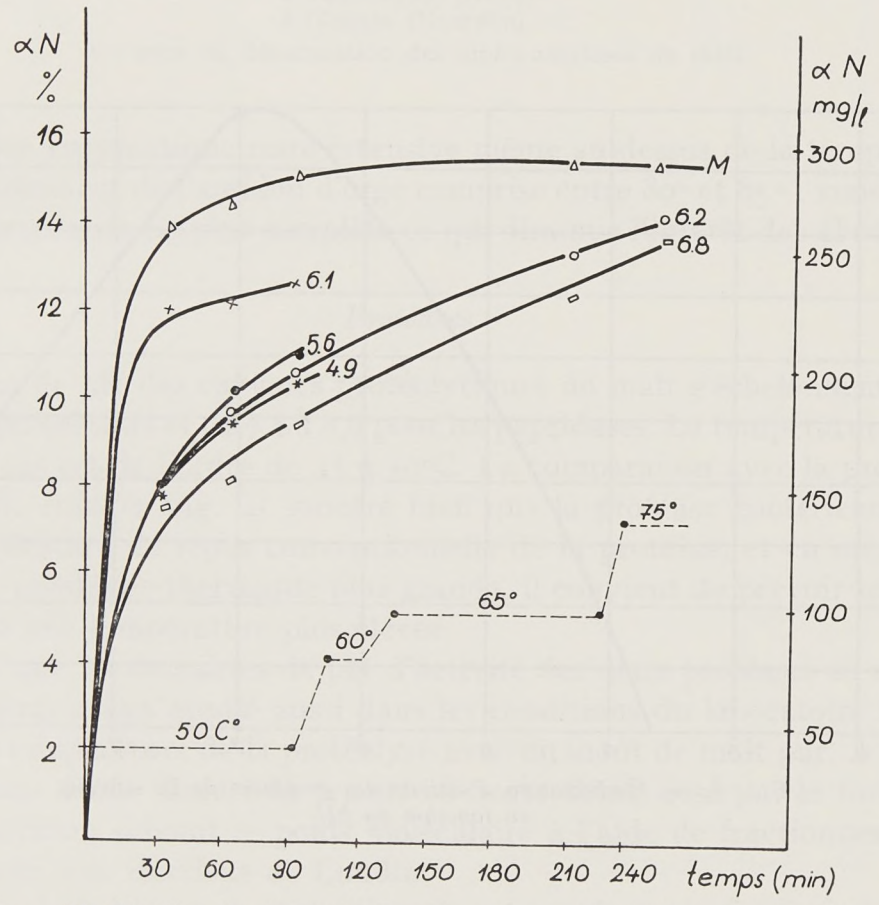


FIG. 7. — *Modification du degré de décomposition* (en *p. 100*) *en fonction du temps, protéolyse exécutée à pH = 4,9 ; pH = 5,6 ; pH = 6,1 ; pH = 6,2 et pH = 6,8*

protéases bactérienne, la dissolution se déroule plus bas que pour l'échantillon de référence de malt à pH de 5,2 : mais l'évolution de la courbe présente un caractère comparable. Dans le domaine de pH de 6,1 à 6,8 la dissolution se fait à un rythme tout à fait identique à celui de l'échantillon témoin.

L'évolution de la teneur en azote alpha-aminé des échantillons de moût présente, elle aussi, un aspect intéressant (fig. 7). Dans les moûts de malt la teneur en azote alpha-aminé augmente brusquement dès le début du repos protéolytique et après 90 minutes elle atteint à peine la valeur définitive. Par exemple, pour les moûts d'orge la teneur en azote alpha-aminé n'accuse après 90 minutes que les trois quarts de la valeur mesurée pour le moût de malt, mais dans la phase suivante de la mise en trempe cet écart se réduit progressivement pour disparaître. Cette différence de rythme de décomposition semble naturelle si l'on compare l'état intrinsèque cellulaire de la protéine de l'orge et du malt.

Lors de l'étude de l'influence de la température sur la protéolyse de l'orge, il apparaît nettement que la dissolution à une température plus élevée pour une conversion plus importante, est la plus favorable et se situe aux environs de 50°C (fig. 8) ;

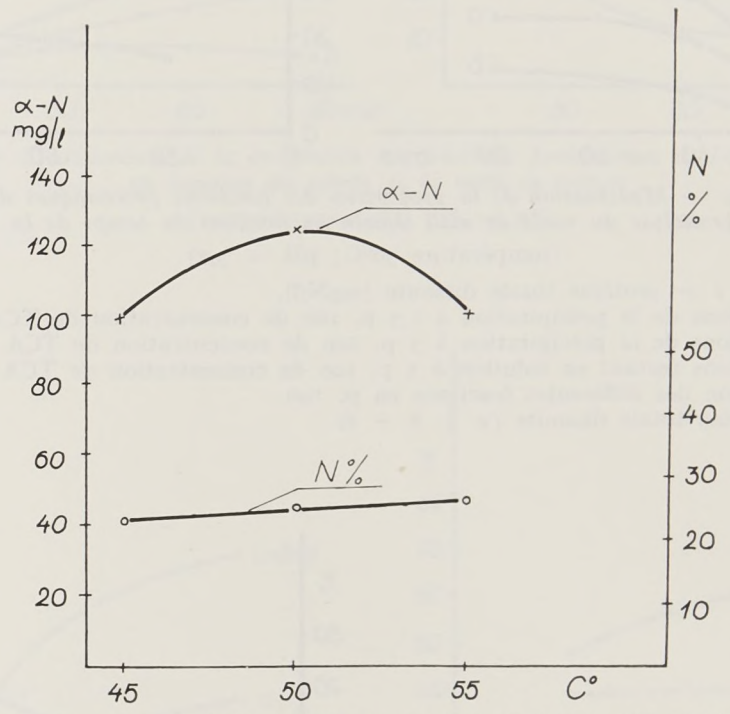


FIG. 8. — *Modification de l'azote total et de l'azote alpha-aminé au cours d'une protéolyse de 90 minutes en fonction de la température de mise en trempe*

mais si l'on confronte les données aux valeurs mesurées lors du contrôle du malt, on trouve que la protéolyse nécessite une dose plus élevée d'enzyme ou bien une poursuite de l'évaporation pour obtenir un résultat identique à celui du contrôle.

A partir des échantillons prélevés lors de l'étude de la dépendance du pH et de la température, nous avons également fait ces fractionnements de TCA pour déterminer la répartition suivant le poids moléculaire de différents échantillons.

La teneur en TCA de 5 p. 100 ou de 2,5 p. 100 une fois réglée nous avons calculé

des fractions *a* et *c* sur la base de la teneur en azote mesurée des surnageants obtenus et suivant le principe connu du fractionnement de Lundin. En traçant la courbe en fonction du temps de la concentration et de la valeur correspondante en pourcentage, nous avons obtenu des courbes de fréquence permettant la comparaison de l'évolution de la distribution des teneurs en protéines de différents essais (fig. 9).

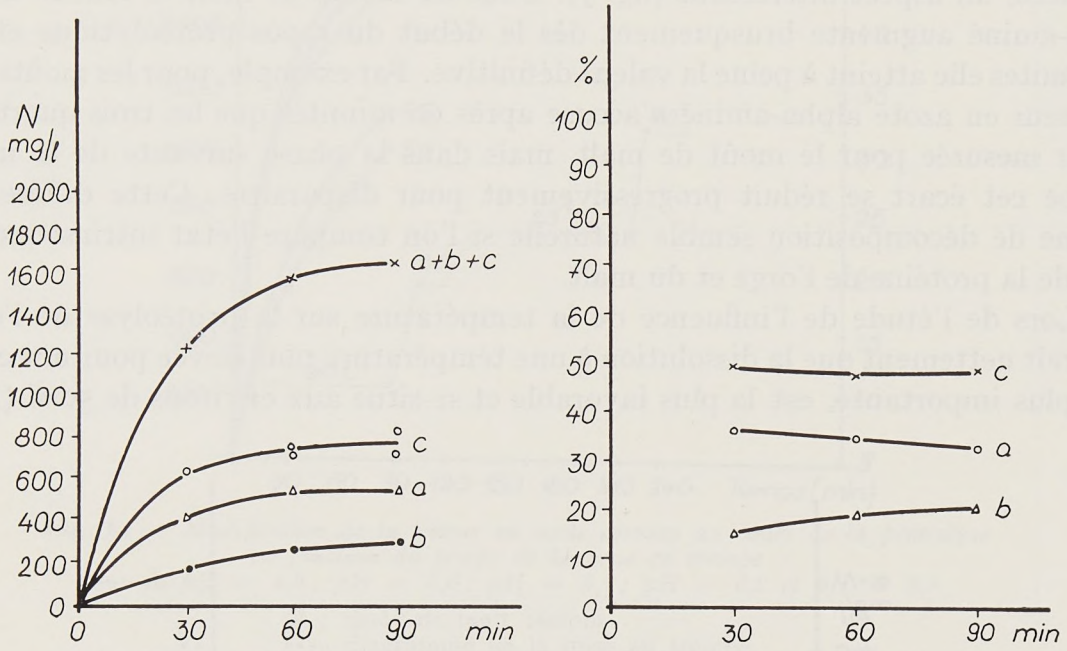


Fig. 9/*a*. — *Modification de la proportion des fonctions protéiniques dissoutes au cours de la protéolyse du moût de malt témoin en fonction du temps de la mise en trempe*

(température 50°C ; pH = 5,2)

a + *b* + *c* = protéine totale dissoute (mgN/l).
a = fractions de la précipitation à 2,5 p. 100 de concentration de TCA (mg N/l).
b = fractions de la précipitation à 5 p. 100 de concentration de TCA (mg N/l).
c = fractions restant en solution à 5 p. 100 de concentration de TCA (mg N/l).
% = relation des différentes fractions en p. 100.
100 % = protéine totale dissoute *(a + b + c)*.

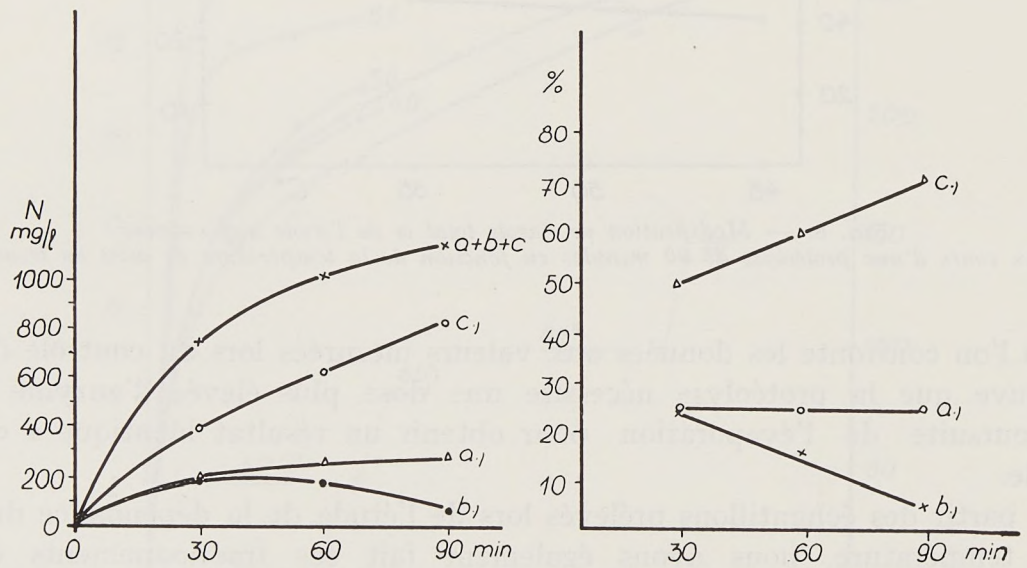


Fig. 9/*b*. — *Modification de la proportion des fractions protéiniques de l'orge solubilisée en fonction du temps de la mise en trempe*

(température 50°C, pH = 4,9)
Désignation comme à la figure n° 9/a

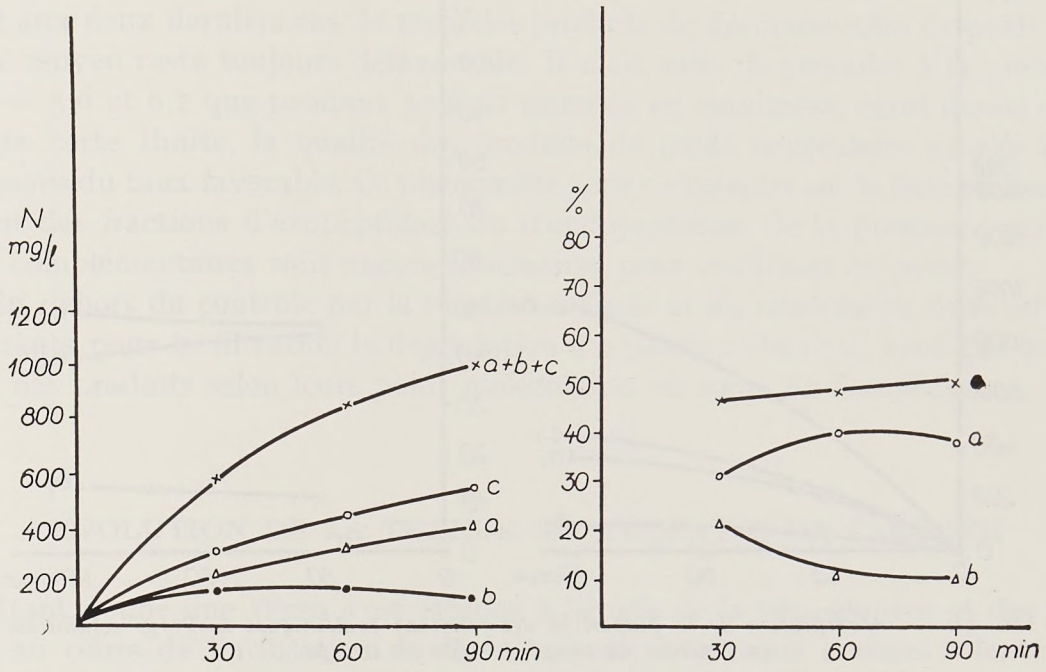


FIG. 9/c. — *Modification de la proportion des fractions protéiniques de l'orge dissoute en fonction du temps de la mise en trempe*

(température 50°C, pH = 5,6)

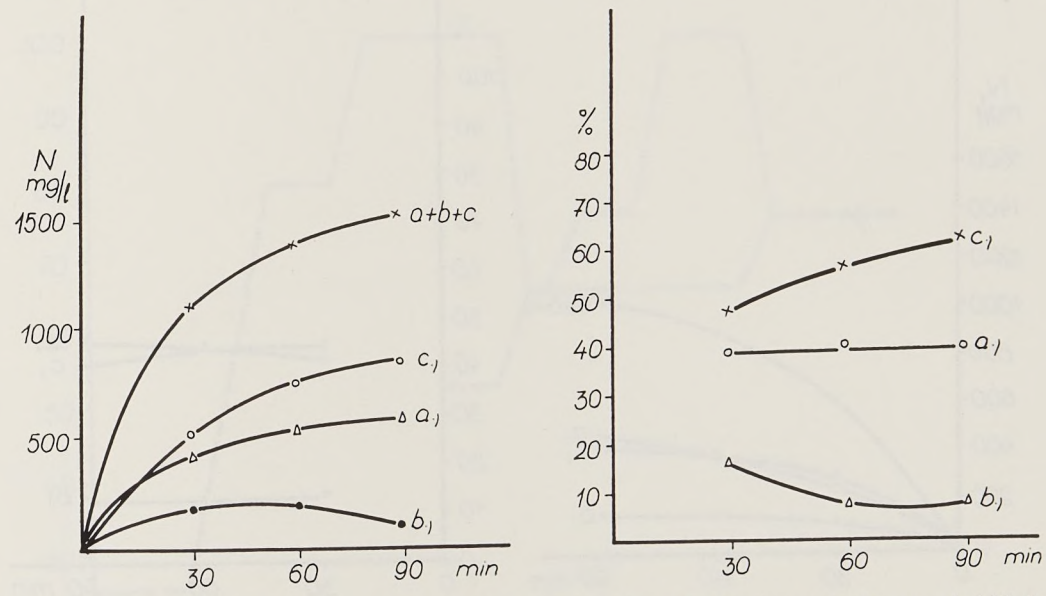


FIG. 9/d. — *Modification de la proportion des fractions protéiniques de l'orge solubilisée en fonction du temps de la mise en trempe*

(température 50°C, pH = 6,1)

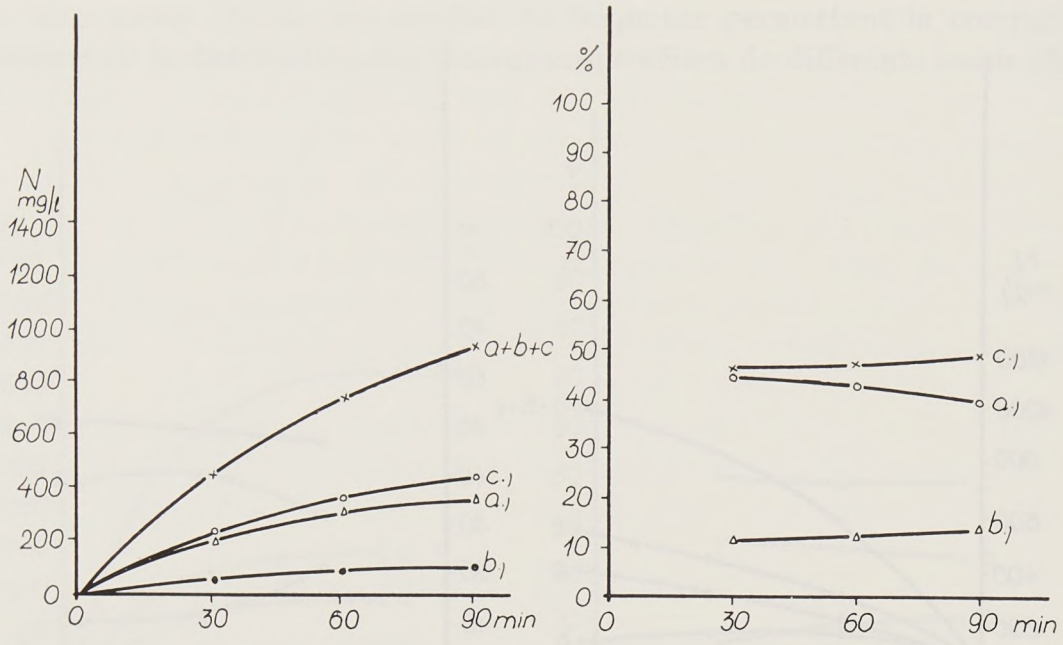


FIG. 9/e. — *Modification de la proportion des fractions protéiniques de l'orge solubilisée en fonction du temps de mise en trempe*

(température 45°C, pH = 5,6)

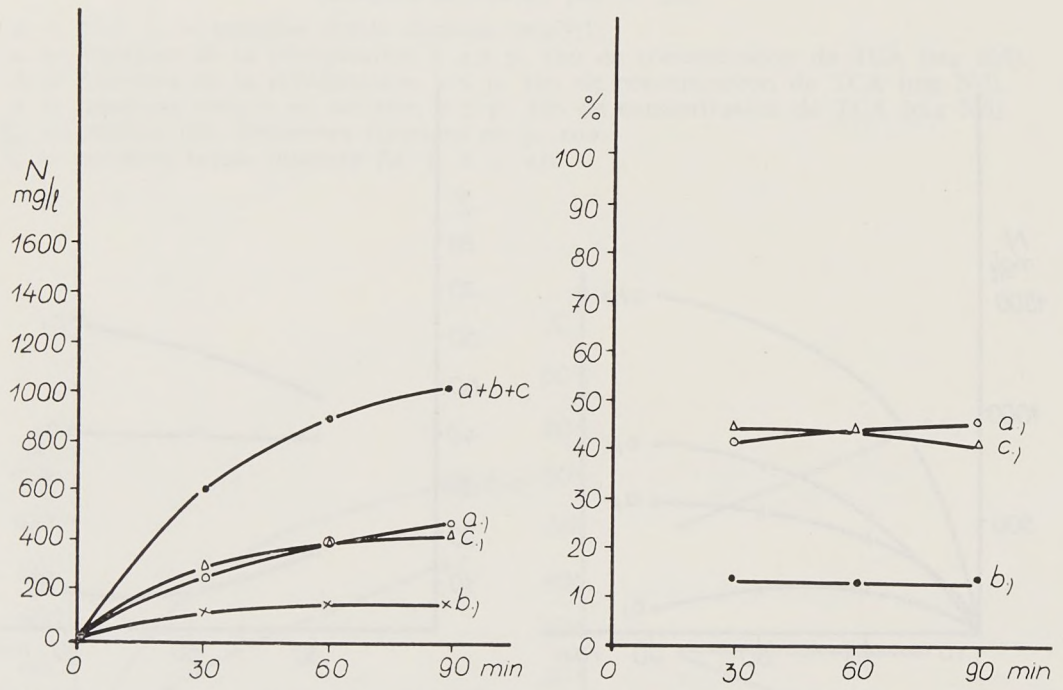


FIG. 9/f. — *Modification de la proportion des fractions protéiniques de l'orge solubilisée en fonction du temps de mise en trempe*

(température 55°C, pH = 5,6)

En conséquence, on constate que les rapports finaux ne correspondent pas avec le contrôle ni à 50°C (pH = 4,9), ni à 45°C (pH = 5,6), ni à 55°C (pH = 5,6). Dans le cas de 50°C c'est le taux de la fraction *c* qui s'enrichit constamment au détriment de la fraction *b* de façon que la répartition ne peut se réaliser à qualité appropriée. Quant aux deux derniers cas, le taux des produits de décomposition de poids moléculaire moyen reste toujours défavorable. Il n'est utile de procéder à la protéolyse à pH = 5,6 et 6,1 que pendant 30 à 60 minutes au maximum, étant donné qu'au-délà de cette limite, la qualité des produits de poids moléculaire moyen tombe au-dessous du taux favorable. Ce phénomène peut s'expliquer sur la base du fonctionnement des fractions d'exopeptidase ou d'endopeptidase de la protéase ; mais des essais complémentaires sont encore nécessaires pour confirmer ce point.

En dehors du contrôle par la réaction à l'iode et du rendement, nous estimons importants pour la filtration la dégradation des parois cellulaires, ainsi que la régulation des produits selon leurs poids moléculaires au cours de l'amylolyse.

ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN HYDRATES DE CARBONE

Étant donné que Wieg s'est attaché à l'étude de la bêta-glucane et des pectosanes au cours de l'utilisation du Brew-n-zyme, nous nous sommes orientés vers l'étude de la régulation du spectre des hydrates de carbone.

Suivant le schéma de mise en trempe représenté sur la figure 10 nous avons effectué des essais de mise en trempe en prenant comme témoin un moût composé

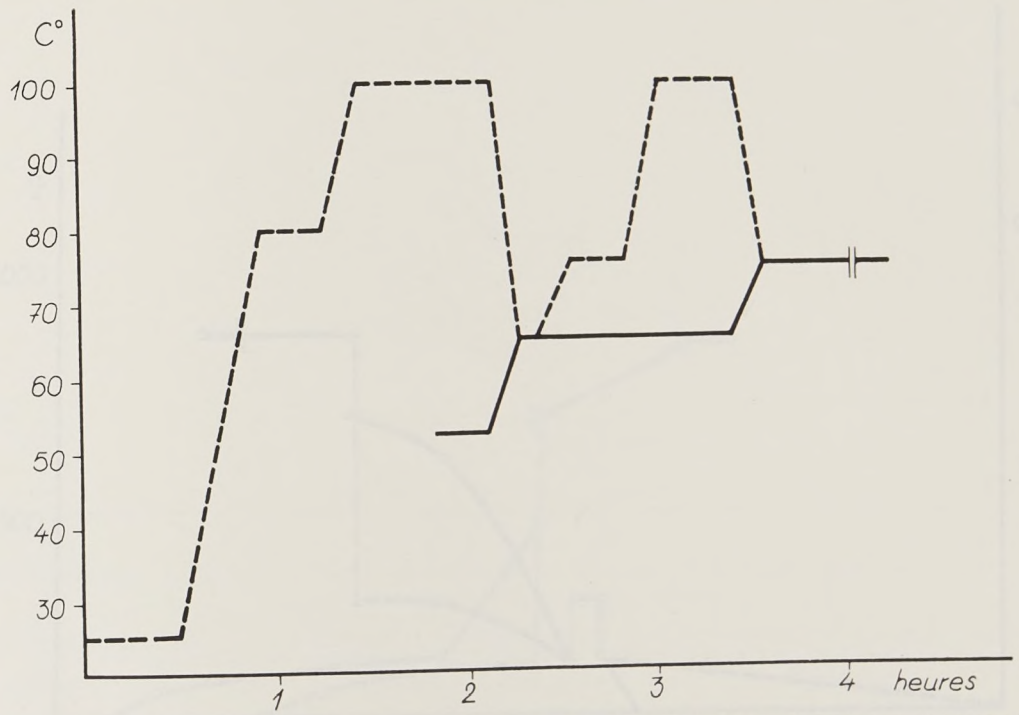


Fig. 10/*a*. — *Diagramme de la température et du temps de mise en trempe semi-industrielle*

Relèvement : 0,15 kg de malt de Pilsen + 0,35 kg de maïs + 3,5 litres d'eau dans le chaudron de mise en trempe.
1,15 kg de malt de Pilsen + 4,5 litres d'eau dans la cuve de mise en trempe.

Désignations : ——— température dans la cuve de mise en trempe
------ température dans le chaudron de mise en trempe

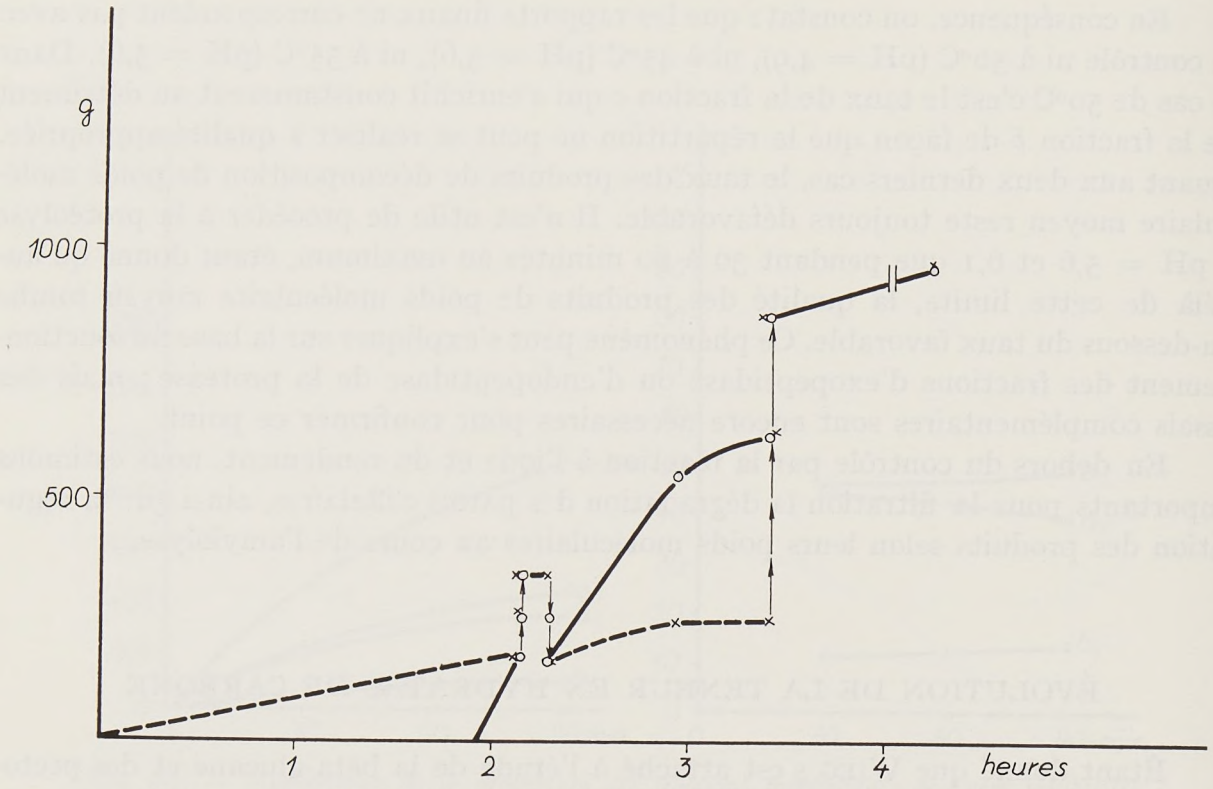


FIG. 10/*b*. — *Modification de la totalité de la teneur en hydrates de carbone au cours de mise en trempe dans la phase liquide*

——— teneur totale en hydrates de carbone dans la cuve de mise en trempe
------ teneur totale en hydrates de carbone dans le chaudron de mise en trempe
↓↑ teneur en hydrates de carbone formés après l'ébouillantage

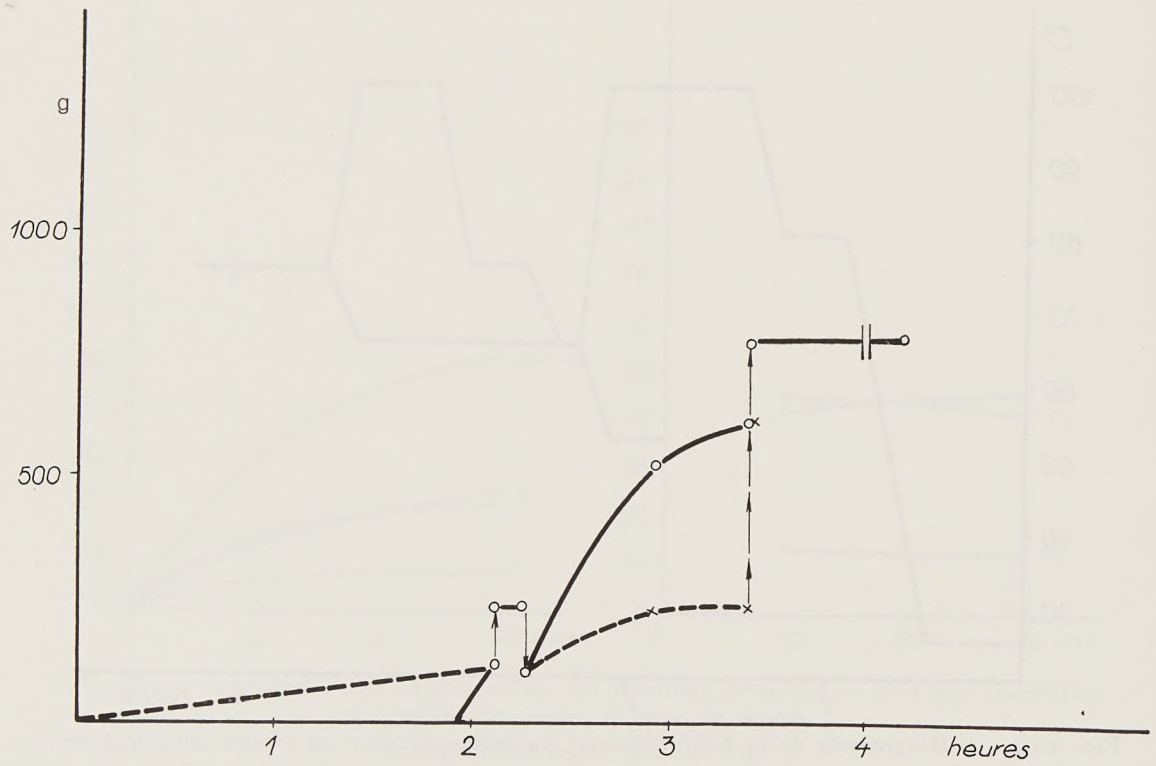


FIG. 10/*c*. — *Modification du sucre réducteur total exprimé en teneur de maltose dans la phase liquide au cours de la mise en trempe de malt*

——— teneur en maltose dans la cuve de mise en trempe
------ teneur en maltose dans le chaudron de mise en trempe
↓↑ teneur en maltose après ébouillantage

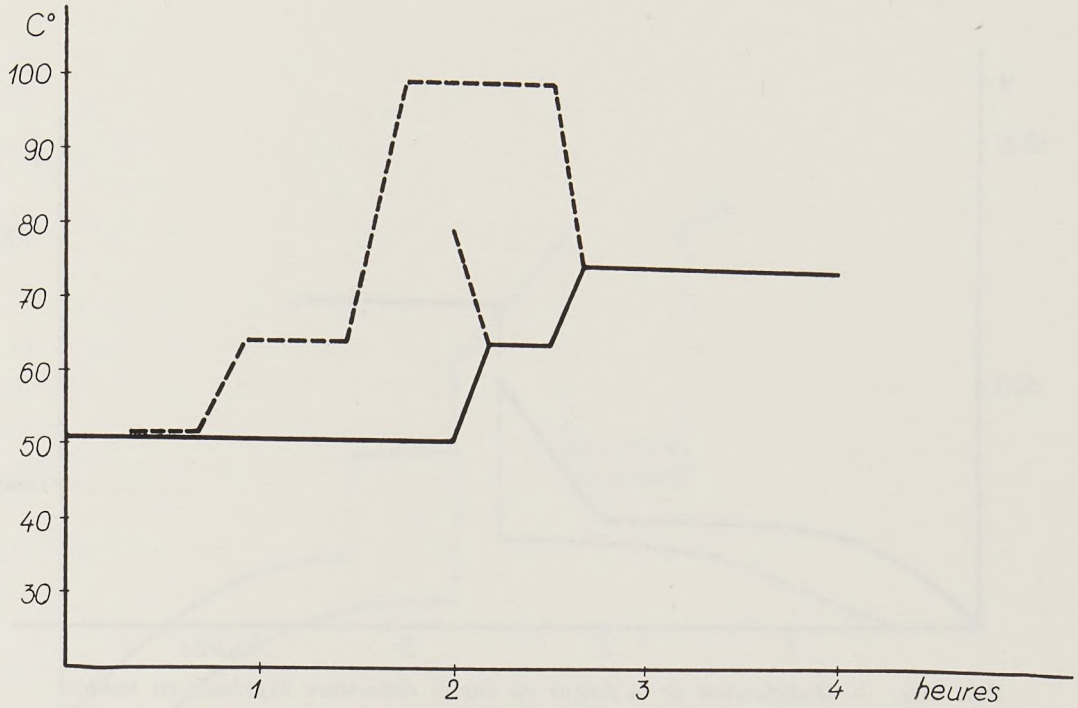


FIG. 11/*a*. — *Diagramme de la température et du temps de mise en trempe semi-industrielle par addition d'enzymes*

Relèvement : 0,15 kg de malt de Pilsen + 0,35 kg de maïs + 2,7 litres d'eau dans le chaudron de mise en trempe.
1,15 kg d'orge + 2,7 litres d'eau + 1,2 kg de Brew-N-zyme dans la cuve de mise en trempe.

Après 2 heures de mise en trempe nous avons augmenté la température dans la cuve à 65°C par addition de 2,7 litres d'eau de 80°C.

Désignations : ——— modification de la température dans la cuve de mise en trempe
------ modification de la température dans le chaudron de mise en trempe.

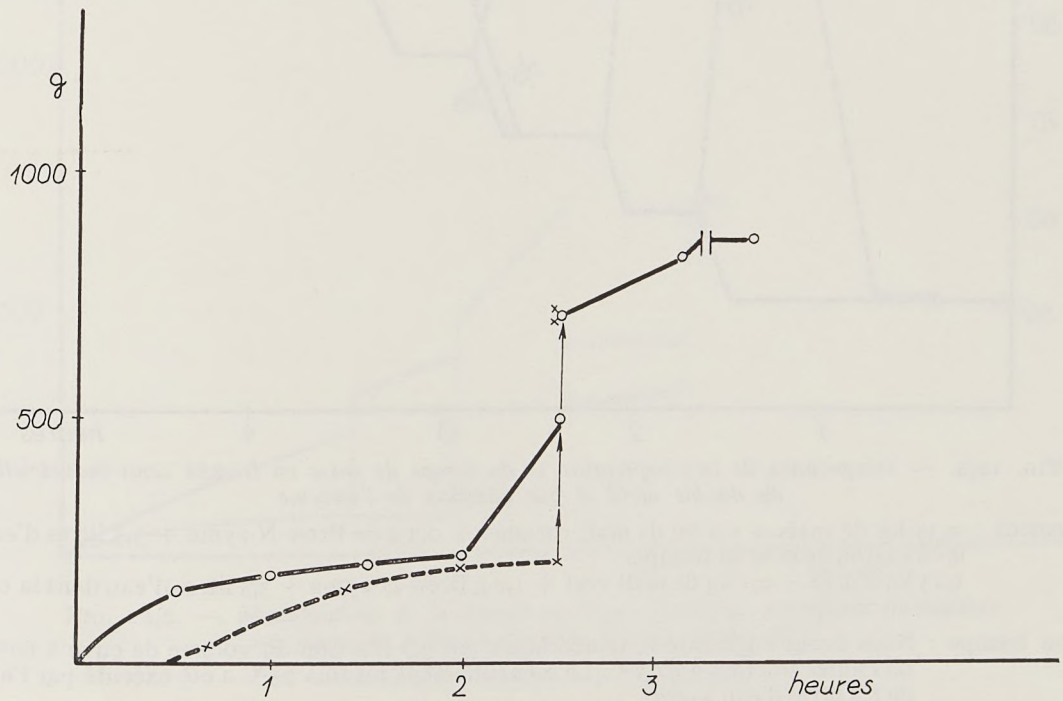


FIG. 11/*b*. — *Modification de la teneur hydrates de carbone dans la phase liquide au cours de mise en trempe enzymatique*

Désignations comme à la figure 10/*b*

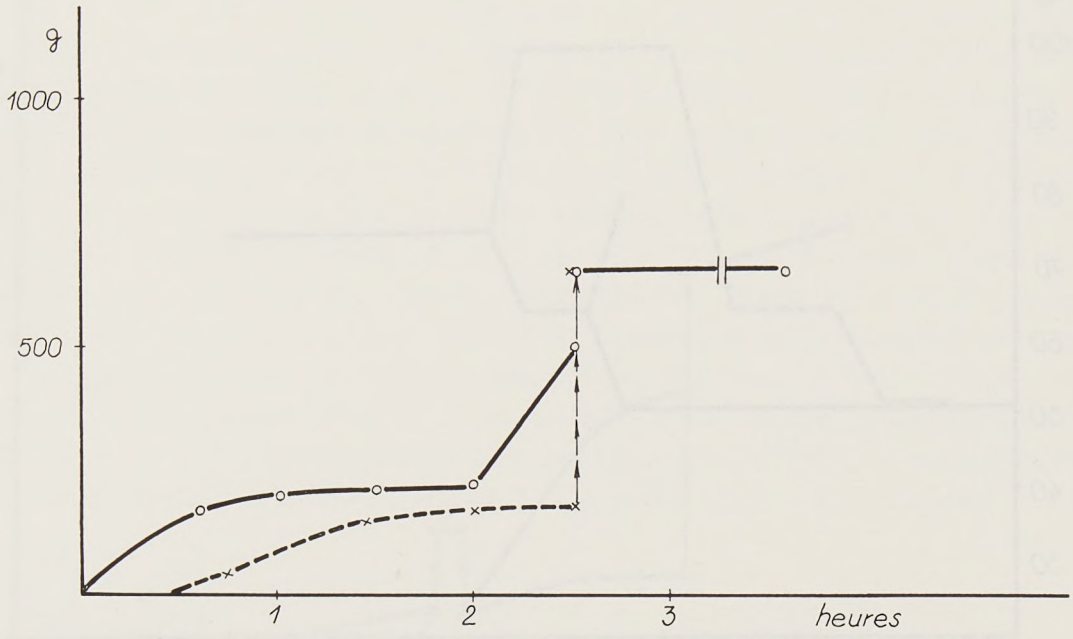


FIG. 11/c. — *Modification de la teneur en sucres réducteurs exprimée en maltose*
Désignations comme à la figure 10/c

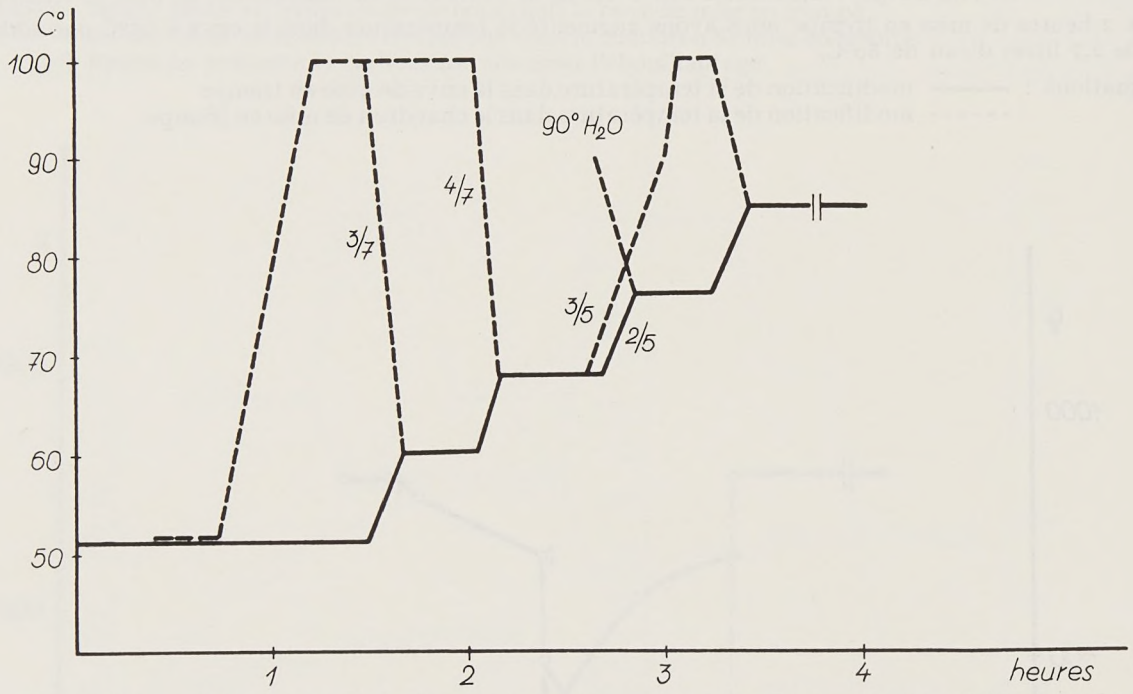


FIG. 12/a. — *Diagramme de la température et du temps de mise en trempe semi-industrielle du double moût et par addition de l'enzyme*

Relevement : 0,33 kg de maïs + 0,1 kg de malt-caramel + 0,3 g de Brew-N-zyme + 3,5 litres d'eau dans le chaudron de mise en trempe.
1,15 kg d'orge + 0,1 kg de malt vert + 1,2 g Brew-N-zyme + 3,5 litres d'eau dans la cuve de mise en trempe

Mise en trempe : Nous avons augmenté la température par 3,7 fraction du volume de cuve à 60°C, puis de l'autre fraction à 67,5°C. Le réchauffement jusqu'à 75°C a été exécuté par l'addition de 1,9 litres d'eau à 90°C.

Désignations comme à la figure 11/a

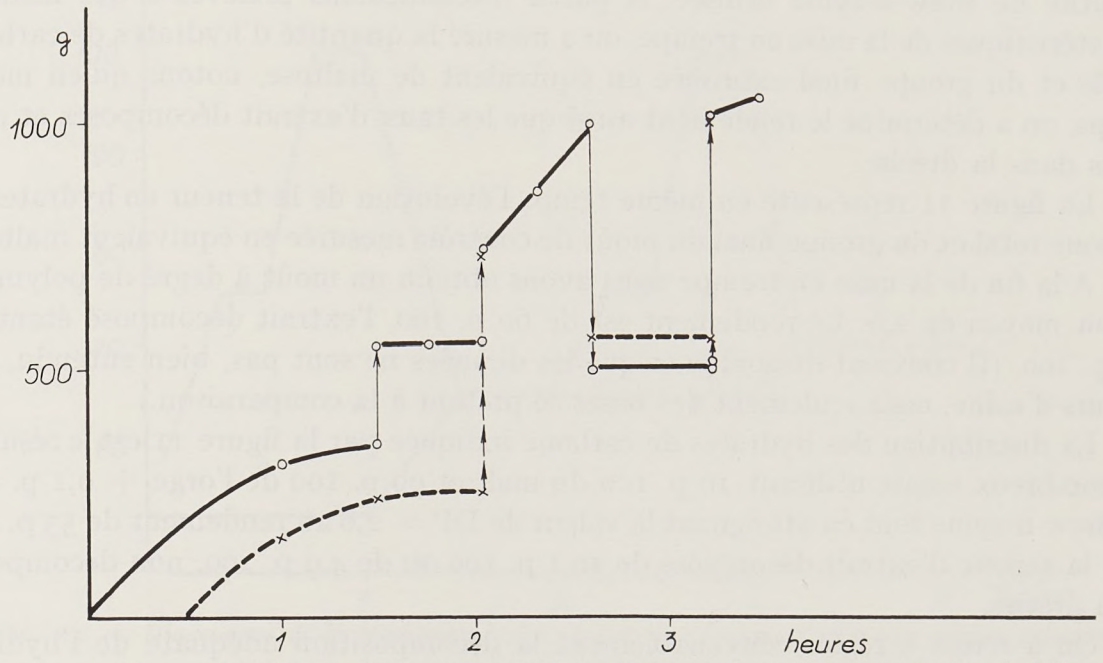


FIG. 12/*b*. — *Modification de la teneur totale en hydrates de carbone dans le jus de bière en cas de mise en trempe selon la figure 12*/a

Désignations comme à la figure 10/*b*

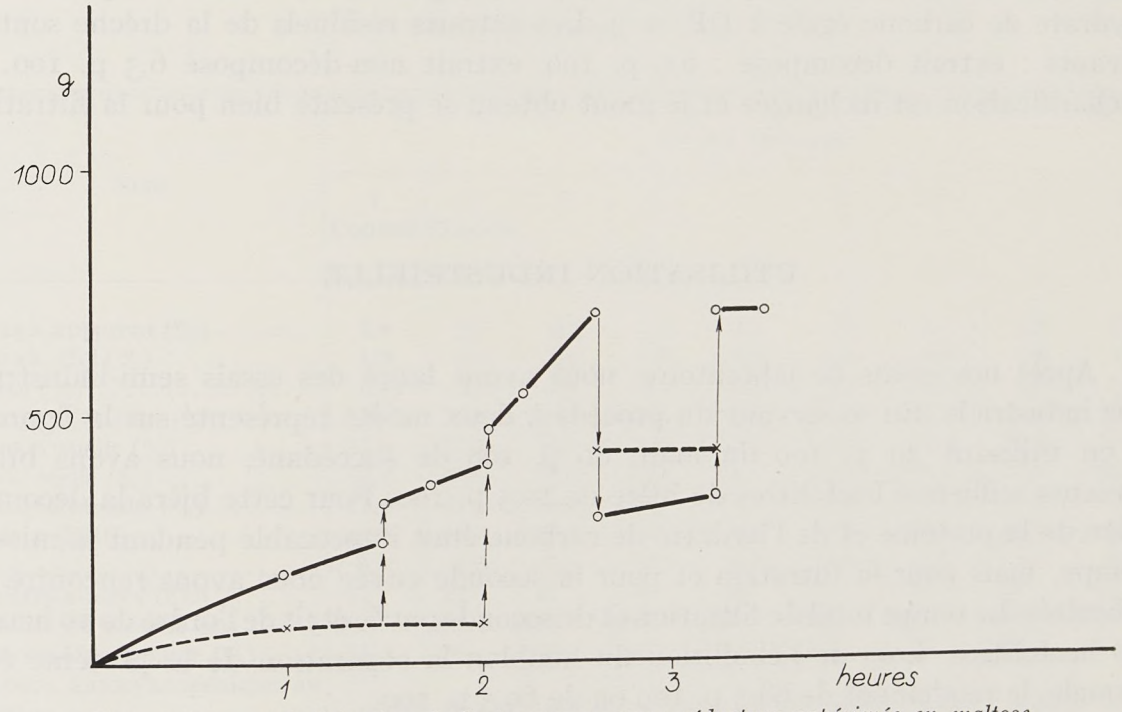


FIG. 12/c. — *Modification de la teneur en sucre réducteur expérimée en maltose au cours de mise en trempe selon la figure 12*/a

Désignations comme à la figure 10/*c*

de 1,3 kg de malt + 0,35 kg de maïs et huit litres d'eau. Lors des essais, nous modifions le taux du rapport malt/orge, la technologie de la mise en trempe et encore la quantité de Brew-n-zyme utilisée. A partir d'échantillons prélevés à des instants caractéristiques de la mise en trempe, on a mesuré la quantité d'hydrates de carbone totale et du groupe final exprimée en équivalent de maltose, notons qu'en même temps, on a déterminé le rendement ainsi que les taux d'extrait décomposés et résiduels dans la drêche.

La figure 11 représente en même temps l'évolution de la teneur en hydrates de carbone total et du groupe final du moût de contrôle mesurée en équivalent maltose.

A la fin de la mise en trempe nous avons obtenu un moût à degré de polymérisation moyen de 2,6. Le rendement est de 60 p. 100, l'extrait décomposé étant de 1,7 p. 100. (Il convient de souligner que les données ne sont pas, bien entendu, des valeurs d'usine, mais seulement des bases se prêtant à la comparaison.)

La distribution des hydrates de carbone indiquée par la figure 11 est le résultat de nombreux essais utilisant 10 p. 100 du malt et 90 p. 100 de l'orge + 0,1 p. 100 de Brew-n-zyme tout en atteignant la valeur de DP = 2,6 au rendement de 55 p. 100 et à la teneur d'extrait décomposé de 10,1 p. 100 ou de 4,9 p. 100, non-décomposés de la drêche.

On a réussi à régler convenablement la décomposition adéquate de l'hydrate de carbone aussi pour les procédés de un, de deux et de trois moûts.

La figure 12 représente la courbe d'un moût brassé par un procédé qui peut être pratiquement considéré comme procédé à deux moûts, composé de 10 p. 100 du malt + 70 p. 100 d'orge et de 20 p. 100 de maïs dont le rendement est supérieur à celui du moût de contrôle (soit de 63 p. 100) présentant une décomposition de l'hydrate de carbone égale à DP = 3. Les extraits résiduels de la drêche sont les suivants : extrait décomposé : 6,9 p. 100, extrait non-décomposé 6,3 p. 100. La saccharification est inchangée et le moût obtenu se présente bien pour la filtration.

UTILISATION INDUSTRIELLE

Après nos essais de laboratoire, nous avons lancé des essais semi-industriels, puis industriels. En se servant du procédé à deux moûts représenté sur la figure 13 et en utilisant 20 p. 100 du malt, 80 p. 100 de succédané, nous avons brassé plusieurs milliers d'hectolitres de bière de 10,5 p. 100. Pour cette bière la décomposition de la protéine et de l'hydrate de carbone était impeccable pendant la mise en trempe, mais pour la filtration et pour la seconde cuvée nous avons rencontré des difficultés. Le temps total de filtration et de seconde cuvée était de l'ordre de 10 heures/310 hectolitres. Lors de l'ébullition du houblon la séparation de la protéine était normale, le rendement de 68,5 p. 100 ou de 69,5 p. 100.

Comme résultat final de 14 brassages au total, on a réussi à réduire le temps de brassage à 13 heures 1/2, dont la durée de filtration et de la seconde cuvée réduite était de 6 h 20 mn à 6 h 40 mn. Les données analytiques des bières obtenues comparées avec les brassages de contrôle sont portées au tableau 2.

Le comportement des bières tant dans le brassin que dans la cuve de fermenta-

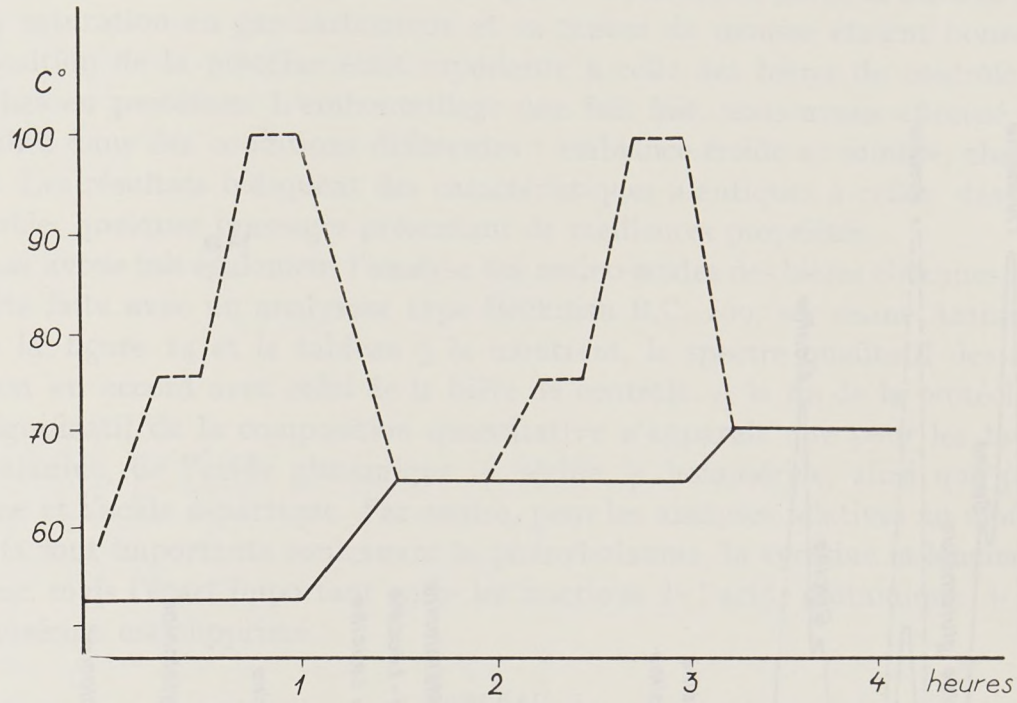


FIG. 13. — *Diagramme de la température et du temps de mise en trempe enzymatique industrielle*

——— température du moût dans le chaudron
------ température du moût dans la cuve

TABLEAU 2

Dosage des bières d'usine

Nom	N° des brassages								
	1 Control	2 Control	3	4	6	7	9	11	14
Extrait apparent (%)	2,8	2,7	2,5	2,9	2,7	2,9	2,5	2,8	2,6
Extrait réel (%)	4,3	4,2	4,0	4,4	4,2	4,3	4,0	4,3	4,1
Alcool (%)	3,4	3,4	3,4	3,1	3,3	3,2	3,5	3,3	3,3
Extrait d'origine (%)	10,8	10,8	10,5	10,4	10,8	10,6	10,8	10,8	10,6
Ferm. visuelle (%)	74,0	75,0	76,5	72,0	75,0	72,6	76,8	74,0	75,5
Ferm. réelle (%)	60,2	60,7	62,3	58,0	60,7	58,9	62,2	60,0	61,2
Ferm. terminale (%)	82,2	81,6	83,2	78,5	78,8	77,5	82,4	79,6	81,2
Couleur (EBC)	13,0	12,4	13,0	13,4	9,8	10,1	10,5	14,0	13,1
pH	4,3	4,5	4,4	4,4	4,6	4,6	4,6	4,5	4,6
Matières amères (EBU)	22	21	21	21	22	22	22	29	21
Stabilité de mousse (s)	407	371	393	392	373	381	360	369	367
Cohérence de mousse (%)	58	50	60	60	50	54	50	52	51
Contenu antocyanogénique au 400-m n	0,357	0,445	0,358	0,374	0,431	0,468	0,516	0,432	0,432
Diacétyl (p.p.m.)	0,2	0,2	0,25	0,10	0,25	0,25	0,2	0,2	0,25
N (mg/l)	404	433	501	442	501	491	606	489	465
Fraction de Lundin (%) A	—	21,2	—	—	29,5	26,9	23,6	28,6	24,6
Fraction de Lundin (%) B	—	24,3	—	—	22,4	23,2	24,6	25,8	23,2
Fraction de Lundin (%) C	—	54,5	—	—	48,1	49,9	51,8	45,6	52,2

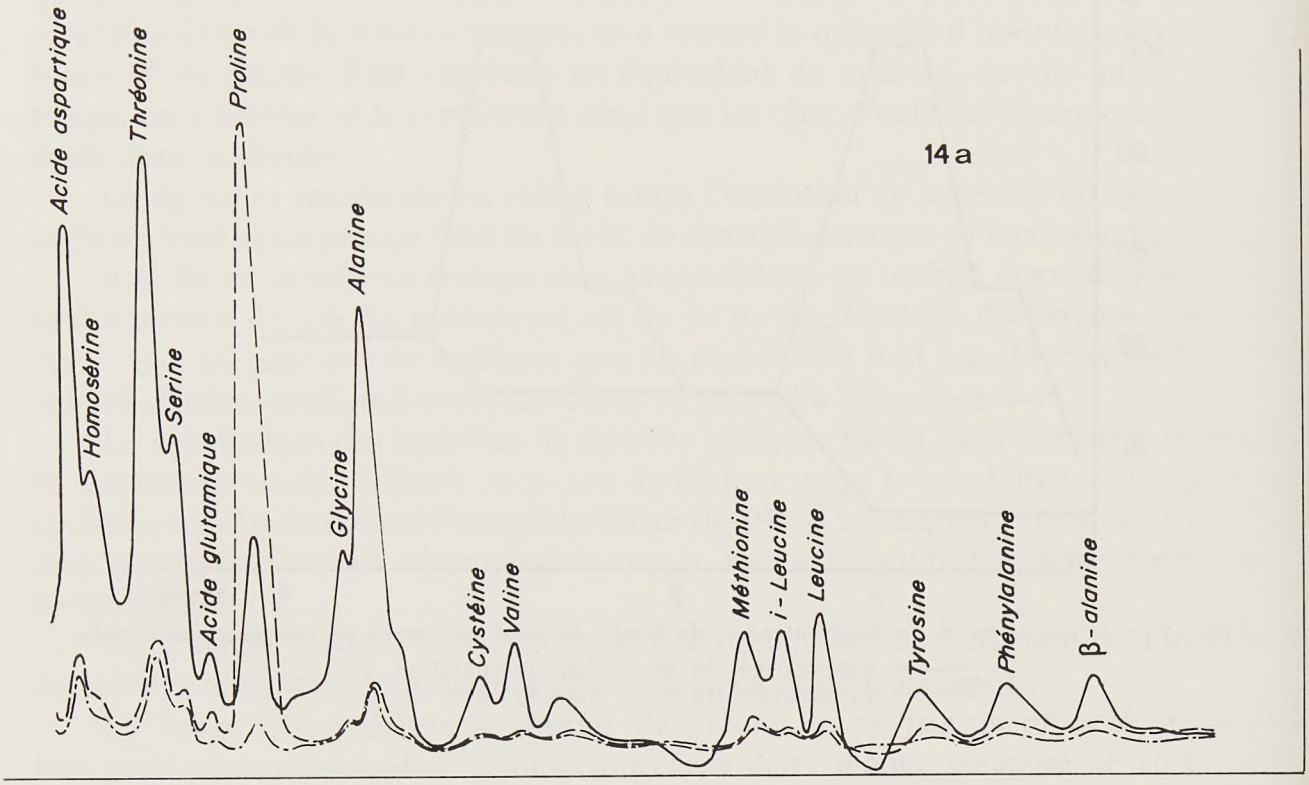


FIG. 14/*a*. — *Teneur en aminoacides libres du moût de contrôle*

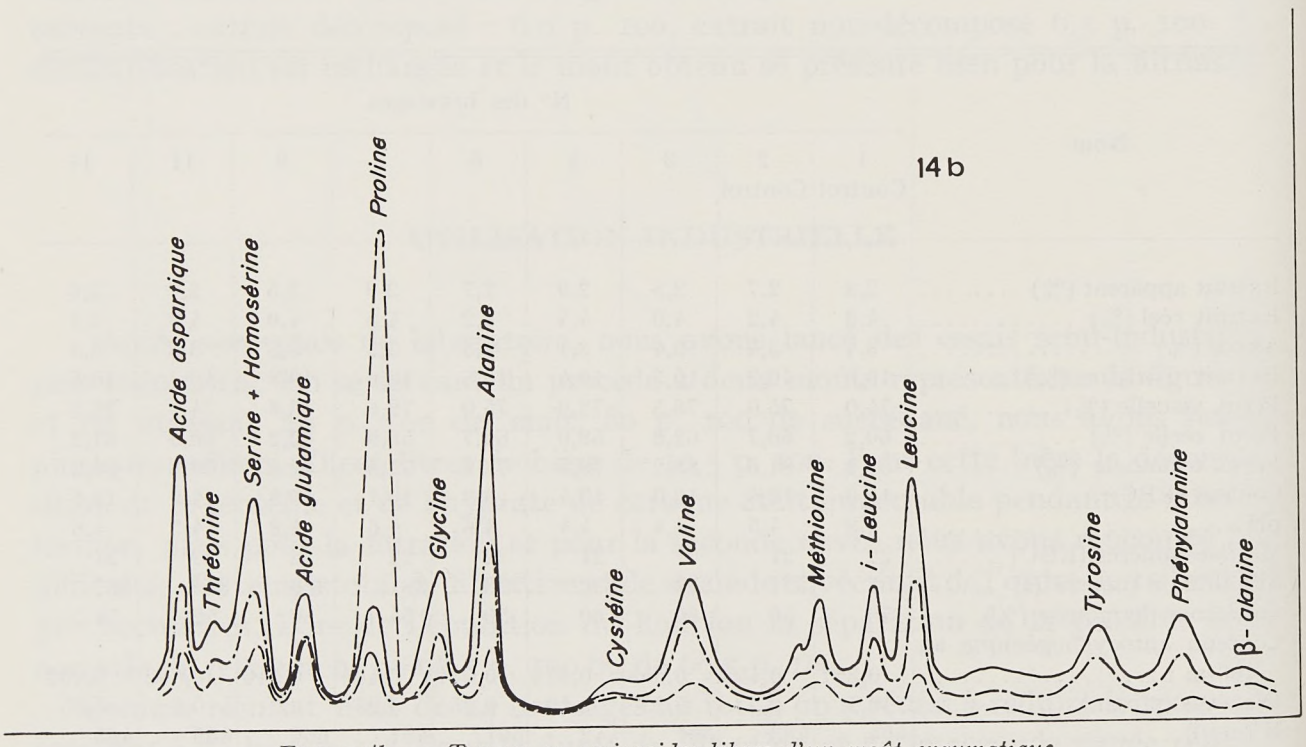


FIG. 14/*b*. — *Teneur en amioacides libres d'un moût enzymatique*

tion et de garde était normal, au bout de quatre semaines de garde la bière se filtrait bien, sa saturation en gaz carbonique et sa teneur de mousse étaient bonnes. La décomposition de la protéine était supérieure à celle des bières de contrôle étant plus riches en protéines. L'embouteillage une fois fait, nous avons effectué l'essai de stabilité dans des conditions différentes : ambiance froide et sombre, chaude et éclairée. Les résultats indiquent des caractéristiques identiques à celles des bières de contrôle, quelques brassages présentant de meilleures propriétés.

Nous avons fait également l'analyse des amino-acides des bières obtenues. L'analyse a été faite avec un analyseur type Beckman B.C. 200, sur résine Aminex A 6. Comme la figure 14 et le tableau 3 le montrent, le spectre qualitatif des amino-acides est en accord avec celui de la bière de contrôle. A la fin de la protéolyse un écart significatif de la composition quantitative n'apparaît que pour les taux des phényl-alanine, de l'acide glutamique + sérine + homosérine, ainsi que pour la thréonine et l'acide aspartique. Par contre, pour les analyses relatives au moût pur, les écarts sont importants concernant la phényl-alanine, la tyrosine la leucine et la thréonine, mais l'écart important entre les fractions de l'acide glutamique + sérine + homosérine est supprimé.

TABLEAU 3

Contenu des acides aminés libres des moûts expérimentaux (%)

Acide aminé	Après la protéolyse		Dans le moût	
	Échantillon enzymatique	Échantillon normal	Échantillon enzymatique	Échantillon normal
Phénylalanine	5,1	3,6	6,7	3,1
Tyrosine	4,9	5,6	5,7	2,4
Acide-β-amino-butyrique	1,7	2,5	—	—
β-alanine	4,2	3,2	2,0	2,3
Leucine	5,4	6,8	6,8	2,7
Isoleucine	3,1	3,2	4,0	2,9
Méthionine	6,2	5,8	5,4	4,1
Valine	5,9	6,3	7,8	5,4
Cystéine + acide γ-amino-butyrique	5,8	6,7	2,7	3,0
Alanine	6,8	7,6	8,7	10,4
Glycine	4,1	4,5	5,9	7,2
Proline	15,2	15,9	18,5	16,8
Acide glutamique + sérine + homosérine	10,2	7,3	13,2	14,6
Thréonine	9,0	10,9	4,2	15,2
Acide aspartique	10,9	8,1	6,8	7,2

CONCLUSION

En récapitulant ce qui vient d'être exposé, on voit que nous avons réussi, lors de nos essais, à régler les conditions de mise en trempe de façon que la teneur en extrait des moûts obtenus par mise en trempe utilisant des enzymes corresponde

à celles des moûts préparés par la méthode classique, et ceci sur la base des spectres tant des protéines que des hydrates de carbone. La Brasserie hongroise tout en modifiant légèrement le procédé au fur et à mesure de la production produit de 2,5 à 3 millions d'hectolitres de bière en se servant d'un taux de succédané important en mettant en œuvre des enzymes industrielles.

SUMMARY

THEORETICAL ASPECTS OF BREWING

The most important phases of brewing are the enzymatic degrading of barley and malt polymers and the conversion, by fermentation, of the products obtained. During selection of industrial proteolytic enzymes, pH and temperature optima must be considered as well as the preparation's exo- and endopeptidase content and also the development of their action in the different conditions of steeping. Proteolytic action was followed by using fractionated trichloracetic precipitation, *i. e.* the use of turbidimetric titration, with trichloracetic acid.

The industrial amylolytic preparation must contain amylase alpha as this enzyme is not found in barley. The amylase alpha must have a high thermic optimum as barley's decomposition takes place with more difficulty than that of malt, the latter having undergone a certain « pre-degradation » during germination. Besides this, the combined effect of amylase alpha, in the industrial enzyme preparation, and amylase beta of barley must be regulated so that a suitable supply of products can be obtained. A photometric method, with iodometric titration, was used to follow the action of the two enzymes mentioned.

The enzymes which have a decomposing effect on the other polyoses react mainly, during malting. However, the steeping of barley must be dealt with separately. This can be done either by the use of a suitable industrial enzyme preparation, or else by regulated titration of malt. The course of the process was followed by using a method of alcoholic precipitation.

By following the polymer degradation processes, and the regulation of them, the neutral protease obtained from *Bacillus subtilis*, *i. e.* amylase alpha, presenting a high tolerance to high temperature, was recognized as being capable of replacing the corresponding malt enzymes.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE THEORETISCHEN GRUNDLAGEN IM BRAUWESEN

Die Wichtigsten Vorgänge beim Brauverfahren sind der enzymatische Abbau der Polymere des Hopfens und des Malzes, sowie die Umwandlung der durch Gärung erhaltenen Stoffe. Bei der Selektionierung der industriellen, proteolytischen Enzyme muss auf die Optima von pH und Temperatur der enzymatischen Präparationen geachtet werden, ferner auf den Gehalt an Exo- und Endo-Peptidasen in der Präparation und die Entwicklung der letzteren unter den verschiedenen Maischbedingungen. Die proteolytischen Vorgänge wurden durch fraktionnierte, trichloressigsäure Niederschläge verfolgt, d. h. unter Anwendung einer Turbidimetrischen Titrierung mittels Trichloressigsäure.

Die amylolytische industrielle Vorbereitung soll Alpha-amylase enthalten, da dies Enzyms nicht im Hopfen enthalten ist. Die Alpha-amylase soll ein hohes thermisches Optimum aufweisen, da der Abbau des Hopfens mit grösserer Schwierigkeit als der des Malzes Stattfindet. Letzteres hat nämlich bereits einen gewissen « Ver-Abbau » im Laufe der Keimung erfahren. Abgesehen hiervon muss der gemeinsame Einfluss der Beta-amylase des Hopfens und der Alpha-amylase komponente in der Vorbereitung des industriellen Enzyms derart geregelt werden, dass man eine geeignete Verteilung der Produkte erhält. Zwecks Verfolgung der Einflüsse der zwei erwähnten Enzyme wird eine photometrische Methode benutzt, die auf jodometrischer Titrierung beruht.

Die Enzyme mit abbauender Aktion gegenüber den anderen Polyosen üben bereits ihren Haupteinfluss bei der Malzbildung. Man muss jedoch besonders aufmerksam bei der Vermaischung

des Hopfens sein, indem man sich einer geeigneten industriellen Enzympräparation bedient oder mittels Dosierung einer nicht zu grossen Menge von Malz. Der Verlauf dieses Verfahrens wurde mit einer alkoholischen Ausfällungsmethode überwacht.

Die Untersuchungen über den Abbau der Polymere und deren Regulierung ergaben, dass die neutrale Protease, die vom *Bacillus subtilis* erhalten wurde, also die Alpha-amylase mit ihrer hohen Unempfindlichkeit gegen Hitzetemperaturen, fähig ist, die entsprechenden Enzyme des Malzes zu ersetzen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Lewis M. J., 1968. *Proc. Biochem.* **3**, 47.

(2) Kunze, 1947. *Technologie für Brauer und Mälzer* Leipzig.

(3) Klopper W. J., 1967-68. *Int. Tijdschr. Browerij en Mouterij*, **27**, 143.

(4) Holló J., 1946. Dissertation, Tech. Univ. Budapest.

(5) Latimer R. A., Lakshminarayanan K., Quittenton R. C., Dennis G. E., 1966. *Inst. Brew. Austr. Sect. Proc. Conf.* **9**, 111.

(6) Macey A., Stowell K. C., White H. B. European Brewery Conv. *Proc. Congr. 11th*, Madrid, 1967, Elsevier, Amsterdam 1968, S. 283.

(7) Schur F., Ullmann F., Schlinger E., Pfenninger H., 1968. *Brauwiss.* **21**, 413.

(8) Beubler A., Dempwolf M., Nielebock C., 1968. *Proc. II. Int. Symp. Gärungsindustr.*, Leipzig, **1**, 175.

(9) Dempwolf M., Ehlies H., Müller-Freymuth H., 1968. *Proc. II. Int. Symp. Gärungsindustr.*, Leipzig, **1**, 295.

(10) Dickscheit R., 1968. *Proc. II. Int. Symp. Gärungsindustr.*, Leipzig, **1**, 5.

(11) Wieg A. J., 1968. *Petit Journ. Brasseur*, 499.

(12) Klopper W. J., 1968. *Brauereitechniker*, **20**, 1.

(13) Klopper W. J., 1969. *Brauwelt.* **109**, 753.

(14) Klopper W. J., 1969. *Brass. Malt. Europe*, **19**, 295.

(15) Boiko L. M., Maltser P. M., Matyukhina V. P., 1968. *Ferment. Spirt. Prom.* **34**, 24.

(16) Nowotny F., Miller K., 1967. *Rocz. Technol. Chem. Zywn.* **13**, 77.

(17) Wieg A. J., Holló J., Varga P., 1969. *Proc. Biochem.* **4**, 33.

(18) László E., Tóth M., 1970. *Soripar Hongroise*, **17**, 66.

(19) László E., Tóth M., 1970. *Soripar Hongroise*, **17**, 122.

(20) Wieg A. J., 1969. *Brew. Digest.* **44**, 56.

(21) Wieg A. J., 1969. *Modern. Brew. Age*, **79**, 44.

(22) Wieg A. J., 1969. *Naarden Nachrichten, Nr.* **204**, 5.

(23) Wieg A. J., 1970. *Brass. Malt. Europe*, **20**, 168.

(24) Wieg A. J., 1970. *Mitt. Versst. Gärungsgew. Wien*, **24**, 171.

(25) Wieg A. J., 1970. *Stärke*, **22**, 200.

(26) Wieg A. J., 1970. *Proc. Biochem.*, **5**, 46.

(27) László E., Tóth M., 1972. *Soripar, elokészületben*, **19**, 81.

(28) Holló J., László E., Tóth M., Wieg A. J., 1971. *Lecture 4th, Europian Symp. Food. Process. Europ. Fed. Chem. Eng.* Frankfurt.

(29) Wieg A. J., 1970. *Stärke*, **22**, 200.

(30) Radley J. A., 1968. *Starch and its Derivates*, 437 pp. Chapman 8 Hall, London, 1968.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 321-334.

DIE TECHNOLOGIE DER BIERHERSTELLUNG MIT ROHFRUCHT UND INDUSTRIELLEN ENZYMPRÄPARATEN

Dipl. Ing. A. J. WIEG

N. V. Chemische Fabriek Naarden, Naarden-Bussum (Holland)

ZUSAMMENFASSUNG

In der halbtechnischen Versuchsbrauerei der Schweizerischen Brauereien (Zürich) wurde bei gleichzeitiger Verarbeitung von Mais der teilweise Einsatz von ungemälzter Gerste anstelle von Malz unter Zugabe von Enzympräparaten für die Bierherstellung geprüft. Im Zusammenhang mit der Nasschrotung war dazu in Vorversuchen die Wasseraufnahme der Gerste in Abhängigkeit von Weichzeit und temperatur zu ermitteln. Ferner galt es, den Einfluss von zwei extremen Weichgraden der Gerste vor dem Quetschen auf deren physikalischen Aufschluss bzw. auf die Ausbeute und Qualität der resultierenden Würzen zu untersuchen. In zwei Reihen von Hauptversuchen wurde dann abgeklärt, wie sich im Vergleich zu Suden aus 85 p. 100 Malz und 15 p. 100 Mais ein Ersatz von 70 p. 100 des Malzes durch rohe Gerste bei Verwendung von Brew-N-Zyme-Präparaten verschiedenen Typs auf die Qualität der so gebrauten Biere auswirkt. Zudem ersetzte man dabei noch den Maisanteil durch Gerste und variierte die Zusammensetzung der Malzschüt tung sowie das Maischverfahren.

Wie die Versuche zeigten, lässt sich Gerste mit Hilfe der Nasschrotung ausgezeichnet verbrauen. Als optimale Weichbedingungen erwiesen sich eine Temperatur von 45° und eine Dauer von 20 mn. Die Verarbeitung von 75 p. 100 Rohfrucht (60 p. 100 Gerste und 15 p. 100 Mais oder 75 p. 100 Gerste) und 25 p. 100 Malz unter Zusatz von Enzymen nahm sowohl bei Anwendung von Infusions — als auch Dekoktions-Einmaisch-Verfahren nicht mehr Zeit in Anspruch wie die Vergleichssude. Dies galt gleichermassen für den Läuterprozess. Die Haupt- und Nachgärung verlief bei den einzelnen Ansätzen durchaus normal.

Sämtliche erzeugten Würzen und Biere unterzog man mittels modernster Analysenmethoden einer gründlichen Untersuchung, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit eingehend diskutiert werden. Was die wichtigsten Qualitätsmerkmale betrifft, so war bei den Gerstenbieren eine hellere Farbe sowie eine bessere Schaumhaltbarkeit und Kältestabilität festzustellen. Durch eine bessere Ausnützung des stets in gleicher Menge dosierten Hopfenextraktes zeigten diese Versuchsbiere auch einen wesentlich höheren Bitterstoffgehalt. Bei den Kostproben hinterliessen die mit einem hohen Schüttungsanteil von Gerste und Brew-N-Zyme hergestellten Biere einen recht guten Eindruck.

EINLEITUNG

In neuerer Zeit erschien eine ganze Reihe von Publikationen über den teilweisen Ersatz des Malzes bei der Bierherstellung durch einen relativ hohen Schüttungsanteil an ungemälzter Gerste unter Verwendung industrieller Enzympräpa-

rate (1-24). Auch stellte man bereits fest, dass für die Verarbeitung von Gerste die Nassschrotung besonders gut geeignet ist (25-31). Die im folgenden diskutierten Untersuchungen zu diesem Themenkreis wurden in der kürzlich beschriebenen neuen Versuchsbrauerei der Versuchsstation Schweizerischer Brauereien (Zürich) (26) zusammen mit Naarden durchgeführt (32). Man verfügt dort über ein Hydro-Automatik-Sudwerk mit einer Kapazität von einem Hektoliter, das unter anderem einen Maischefertiger, fünf Braugefässe und einen Whirlpool umfasst. Im Keller befinden sich sechs Gär- und zwölf Lagertanks, die einzeln und automatisch regulierbar gekühlt werden können.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Mit dem Maischefertiger der Pilot-Anlage bot sich erstmals die Möglichkeit, im halbtechnischen Massstab die optimalen Parameter der Nassschrotung von Gerste zu ermitteln. Dabei wurde vorerst anhand der Zunahme des Tausendkorngewichtes die Wasseraufnahme der Gerste in Abhängigkeit von der Weichzeit bestimmt. Aus Abb. 1 geht hervor, dass die Wasseraufnahme der verwendeten Gerste bei einer Temperatur von 50°C mit zunehmender Weichzeit ausgeprägt degressiv verlief. Der

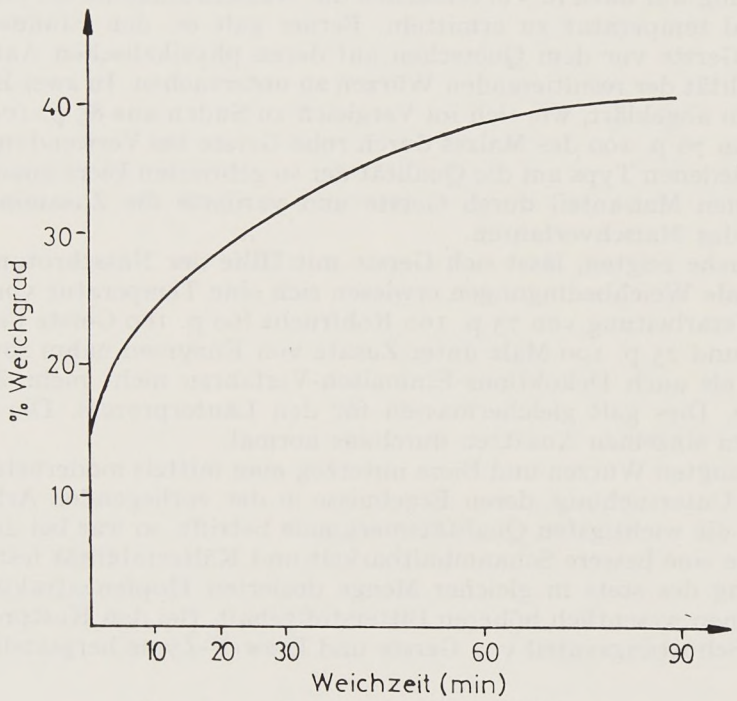


Fig. 1. — *Wasseraufnahme bei 50°.*

Weichgrad lag in den beiden extremen Versuchsansätzen mit 10 und 90 Min. Weichzeit bei etwa 25 bzw. 40 p. 100. Als Folge des zunehmenden Weichgrades machte sich eine deutliche Verzögerung des Schrotprozesses bemerkbar, was vermutlich auf die damals noch nicht doppelt geriffelten Quetschwalzen des Pilot-Plant-Maischefertigers zurückzuführen war. In Tabelle 1 sind die in der Gesamtmaische unmittelbar nach dem Schroten bestimmten Werte für die Viskosität und den Gehalt an redu-

zierenden Zuckern zusammengestellt. Wie daraus zu erkennen ist, nehmen sie innerhalb der ersten 30 Min. weniger zu als während einer darüber hinaus verlängerten Weichzeit. Dies dürfte auf eine bereits einsetzende Verkleisterung und Enzym-

TABELLE I

Gesamtmaische nach dem nassschroten der gerste
(Weichtemperatur 50°C)

Weichzeit (mn)	Viskosität (1) (cPo)	Reduz. Zucker (2) (g/l)
10	3,35	3,0
20	5,12	3,6
30	5,20	4,1
60	15,80	8,4
90	— (3)	— (3)

(1) Bestimmt mittels EPPRECHT-RHEOMAT 15 (Contraves).
(2) Bestimmt nach POTTERAT-ESCHMANN.
(3) Nicht bestimmt, da unzentrifugierbar.

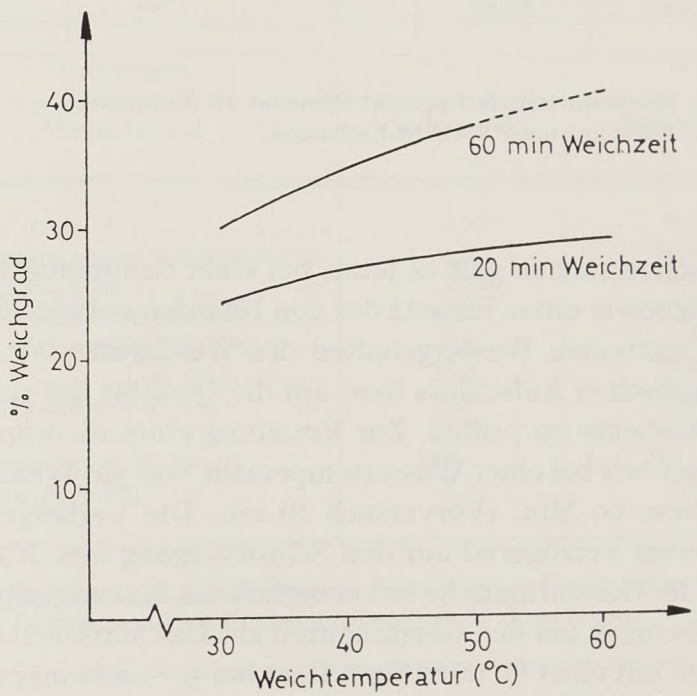


FIG. 2. — *Wasseraufnahme bei 20 und 60 min Weichzeit.*

wirkung zurückzuführen sein. In Abb. 2 ist der Verlauf der Wasseraufnahme bei einer Weichdauer von 20 und 60 Min. gegen die Weichtemperatur aufgetragen. Aus dem Vergleich der beiden Kurven mit der vorher erwähnten lässt sich schliessen, dass der Weichgrad der Gerste durch die Weichtemperatur offensichtlich weniger

stark beeinflusst wird als durch die Weichzeit. Eine Steigerung der Temperatur von 30 auf 50° brachte bei den Versuchen mit 20 minütiger Weichzeit eine Zunahme des Wassergehalts um etwa 4 p. 100, bei denjenigen mit 60 Min. Weichen eine solche von 8 p. 100. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass die Viskosität der Gesamtmaische sowie deren Gehalt an reduzierenden Zuckern bei Konstanter Weichzeit mit steigender Weichtemperatur — vor allem über 50° — stark progressiv zunimmt. Man kann dies mit der grossen Temperaturabhängigkeit das Verkleisterns und der Wirkung der präexistierenden Gerstenenzyme erklären. Im Hinblick auf die Schrotzeit und die Viskosität der Gesamtmaische ist es demnach nicht sinnvoll, länger als 20-30 Min. und bei einer höheren Temperatur als 50° zu weichen.

TABELLE 2

Gesamtmaische nach dem nassschroten der gerste

Weichtemp. (°C)	Weichzeit in Minuten			
	20	60	20	60
	Viskosität (1)		Reduz. Zucker (2)	
	(cPo)	(cPo)	(g/l)	(g/l)
30	1,81	1,80	1,1	1,0
40	2,06	2,41	1,2	1,4
50	5,12	15,80	3,6	8,4
60	61,00	—	9,5	—

(1) Bestimmt mittels Epprecht-Rheomat 15 (Contraves).
(2) Bestimmt nach Potterat-Eschmann.

In zwei Maischversuchen galt es jetzt, bei einer Schüttung von 75 p. 100 Gerste und 25 p. 100 Malz sowie unter Einsatz des von Naarden entwickelten Brew-N-Zymes den Einfluss von extremen Wassergehalten des Weichgutes vor der Nassschrotung auf dessen physikalischen Aufschluss bzw. auf die Qualität der resultierenden Würze und die Extraktausbeute zu prüfen. Zur Erzielung eines niedrigen und eines hohen Weichgrades hielten wir bei einer Wassertemperatur von 50° Weichzeiten von 10 Min. (Vorversuch A) bzw. 60 Min. (Vorversuch B) ein. Die Verlängerung des Weichens wirkte sich wiederum verzögernd auf den Schrotvorgang aus. Nach dem Nassschroten dosierte man der Gesamtmaische unverzüglich das Enzympräparat in einer Menge von 0,075 p. 100 bezogen auf den Gerstenanteil zu. Das Maischen erfolgte nach einem Infusionsverfahren mit einer 60 minütigen Rast bei 50° und einer solchen von 90 Min bei 63°. Die Abmaischtemperatur betrug jeweils 75°. Die Untersuchung der aus dem Läuterprozess anfallenden Vorderwürzen (Tabelle 3) ergab, dass sich mit zunehmendem Weichgrad deren Viskosität nur schwach, der Trübungsgrad jedoch auffallend erhöhte. Was die Untersuchungsergebnisse der Pfanne-voll-Würzen (Tabelle 4) betrifft, so lagen die Unterschiede bezüglich Extrakt, Endvergärungsgrad, Farbe sowie der Stickstoffverhältnisse durchwegs innerhalb des Vertrauensbereichs der

Analysen. Auch die Extraktausbeuten differierten kaum. Hingegen blieb die leichte Tendenz zu einer Erhöhung der Würzeviskosität mit steigendem Weichgrad bis zu den Pfanne-voll-Proben erhalten.

TABELLE 3

Vorderwürzen aus den maischversuchen mit schüttungen unterschiedlichen weichgrades

Vorversuch	A	B
Verzuckerung	jodnormal	jodnormal
Extrakt (Gew. %)	17,09	17,06
Viskosität (1) bei 20°C (cPo)	2,35	2,40
Trünbung bei 60°C (EBC-Einh)...	35	53

(1) Bestimmt mittels EPPRECHT-RHEOMAT 15 (Contraves).

TABELLE 4

Pfanne-voll-würzen aus den maischversuchen mit schüttungen unterschiedlichen weichgrades

Vorversuch	A	B
Verzuckerung	Jodnormal	Jodnormal
Extrakt (Gew. %)	9,93	9,93
Endvergärungsgrad scheinbar (%).	82,2	80,9
Farbe (EBC-Einh.)	7,25	7,0
Gesamtstickstoff (mg/100 g)	82,0	80,3
Koagul. Stickstoffff (mg/100 g) ...	8,0	7,5
Lundin-Fraktion A (%).....	28,3	27,8
Lundin-Fraktion B (%).....	18,8	19,5
Lundin-Fraktion C (%).....	52,9	52,7
α-Aminostickstoff (1) (mg/l)	219	218
Viskosität (2) (cPo)	1,57	1,60

(1) Bestimmt mit TNBS-Reagens, Eichkurve mit Glycin aufgenommen.
(2) Bestimmt mittels EPPRECHT-RHEOMAT 15 (Contraves).

In den folgenden Brauversuchen wollten wir nun abklären, wie sich ein Ersatz von etwa 70 p. 100 der Malzschüttung durch ungemälzte Gerste bei gleichzeitiger Verarbeitung von 15 p. 100 Maisstärke auf die Qualität der mit Hilfe von Brew-N-Zyme gebrauten Würzen und Biere auswirkt. Ferner sollten in dieser Testreihe auch unterschiedliche Typen des Enzympräparates mit veränderten amylolytischen und

proteolytischen Komponenten geprüft und zudem noch die Zusammensetzung des Restmalzanteils durch Mischen verschiedenartiger Malze variiert werden. Zu diesem Zweckebrauten wir hintereinander sechs Sude gemäss folgender Versuchsanstellung :

Sud	*Schüttung* (%)		*Enzymzusatz* (%) (1)
A′ (Vergleich)	Pilsnermalz	85	
	Maisstärke	15	—
B′	Pilsnermalz	25	
	Gerste	60	Brew-N-Zyme BR 0,075
	Maisstärke	15	
C′	Pilsnermalz	25	
	Gerste	60	Brew-N-Zyme BRP 0,075
	Maisstärke	15	
D′	Pilsnermalz	25	
	Gerste	60	Brew-N-Zyme BRA 0,075
	Maisstärke	15	
E′	Pilsnermalz	10	
	Lagermalz	10	
	Diastasemalz	5	Brew-N-Zyme BR 0,075
	Gerste	60	
	Maisstärke	15	
F′	Lagermalz	15	
	Diastasemalz	10	Brew-N-Zyme BR 0,075
	Gerste	60	
	Maisstärke	15	

TABELLE 5

Anstellwürzen aus der ersten reihe von brauversuchen

Sud	A′	B′	C′	D′	E′	F′
Verzuckerung	jod-normal	jod-normal	jod-normal	jod-normal	jod-normal	jod-normal
Extrakt (Gew. %)	12,1	11,7	11,6	11,8	12,1	12,1
Reduz. Zucker (1) (Gew. %)	9,8	9,0	8,9	9,1	9,2	9,0
Endvergärungsgrad scheinbar (%)	89,9	83,1	83,0	80,2	79,6	80,0
Farbe (EBC-Einh.)	13,0	12,5	13,5	14,5	14,5	15,0
Gesamtstickstoff (mg/100 g) (2)	83,0	75,8	78,1	72,5	72,0	71,6
Koagul. Stickstoff (mg/100 g) (2)	2,8	2,9	3,0	1,3	1,3	2,0
Lundin-Fraktion A (%)	20,1	26,8	30,9	29,5	27,9	30,2
Lundin-Fraktion B (%)	16,2	20,2	18,4	20,3	20,3	19,5
Lundin-Fraktion C (%)	63,7	53,0	50,7	50,2	51,8	50,3
α-Aminostickstoff (3) (mg/l) (2)	304	212	214	207	222	211
Trubgehalt (4) (mg/l)(2)	175	134	158	145	148	145
Anthocyanogene (5) (E 546 nm) (2)	0,24	0,16	0,19	0,17	0,17	0,19
Bitterstoffe (BE)	40	44	45	44	43	46

(1) Bestimmt nach Potterat-Eschmann.
(2) Auf 12 p. 100 berechnet.
(3) Bestimmt mit TNBS-Reagens, Eichkurve mit Glycin aufgenommen.
(4) Bestimmt nach Narziss und Miedaner (bei + 2°C).
(5) Bestimmt nach Harris und Ricketts.

(1) Bezogen auf den Rohfruchtanteil.

Dabei wandten wir ein Dekoktions-Einmaisch-Verfahren an, das durch die Zugabe der Maisstärke zur Kochmaische bei 50°, eine Maltoserast der Gesamtmaische von 90 mn bei 63° und das Einhalten der Abmaischtemperatur von 75° während 30 mn gekennzeichnet war. Das Abläutern erfolgte stets raschmöglichst und nahm jeweils etwas mehr als drei Stunden in Anspruch. Der weitere Versuchsablauf richtete sich nach einem normalen Verfahren zur Herstellung untergäriger Biere. Wie die Analysen der Würzen und Biere (Tabellen 5 und 6) erkennen liessen, führte

TABELLE 6

Ausstossbiere aus der ersten reihe von brauversuchen

Sud	A′	B′	C′	D′	E′	F′
Stammwürze (Gew. %)	12,2	11,6	11,6	11,7	11,8	12,1
Alkohol (Gew. %)	4,36	3,72	3,69	3,58	3,69	3,69
Extrakt scheinbar (Gew. %)	1,76	2,73	2,78	3,12	3,00	3,32
Extrakt wirklich (Gew. %)	3,73	4,41	4,45	4,74	4,66	4,98
Vergärungsgrad (Vs) (%)	85,6	76,5	76,1	73,3	74,6	72,6
Endvergärungsgrad (EVs) (%)	89,8	83,4	83,2	80,4	80,3	80,5
Farbe (EBC-Einh.)	8,5	7,5	8,5	9,0	8,5	9,0
pH	4,45	4,55	4,55	4,55	4,60	4,55
Schaumziffer (1)	108	118	115	118	118	117
Gesamtstickstoff (mg/100 g) (2)	56,5	54,8	57,0	54,1	56,2	52,9
Koagul. Stickstoff (mg/100 g) (2)	2,0	1,9	2,0	2,0	2,3	1,9
Lundin-Fraktion A (%)	15,8	24,0	30,2	28,5	27,6	29,1
Lundin-Fraktion B (%)	20,7	28,4	24,7	21,3	29,5	26,8
Lundin-Fraktion C (%)	63,5	47,6	45,1	50,2	42,9	44,1
α-Aminostickstoff (3) (mg/l) (2)	96	51	54	45	57	44
Anthocyanogene (4) (E 546 nm) (2)	0,12	0,07	0,09	0,08	0,12	0,11
Bitterstoffe (BE)	25	27	27	30	32	33
Diacetyl (5) (mg/l)	0,01	0,05	0,04	0,08	0,08	0,11
2,3-Pentandion (5) (mg/l)	0,01	0,05	0,04	0,06	0,06	0,06
Forciertest 40°/0°C	Trübungszunahme in EBC-Formazineinheiten					
1. Warmtag 24 Std. 0°	0,9	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4
2. Warmtag 24 Std. 0°	2,2 (T)	0,1	0,4	0,4	0,1	0,4
3. Warmtag 24 Std. 0°	—	0,1	0,6	1,2 (S)	0,4	0,7
4. Warmtag 24 Std. 0°	—	0,2	1,0 (S)	1,3 (S)	1,2 (S)	0,5

(1) Bestimmt nach Ross und Clark.
(2) Auf 12 p. 100 Stammwürze berechnet.
(3) Bestimmt mittels TNBS-Reagens, Eichkurve mit Glycin aufgenommen.
(4) Bestimmt nach Harris und Ricketts.
(5) Gaschromatographisch bestimmt.
S : Schleier visuell.
T : Trübung visuell.

die vorgenommene Veränderung der proteolytischen Komponente (Sud C′) des normalen Brew-N-Zyme (Sud B′) nur zu einer geringfügigen Erhöhung des Gesamtstickstoffgehaltes, die jedoch ausschliesslich aus einer vermehrten Lösung von hochmolekularem Eiweiss bestand. Dies spiegelte sich auch in einer entsprechenden Zunahme

des Kühltrubanteils in der Würze und in einer schlechteren kolloidalen Stabilität des Bieres wieder. Zudem waren in der Würze und im Bier etwas mehr Anthocyanogene festzustellen. Was den Austausch der amylolytischen Komponente des Standardenzymkomplexes (Sud D') betraf, so erbrachte dies hinsichtlich der Würze- und Bierzusammensetzung nicht die erwarteten Vorteile. Trotz teilweisem (Sud E') oder ganzem Ersatz (Sud F') des Pilsner-Malzes durch eine Mischung von zwei eiweissreichen, aber extrem unterschiedlich enzymstarken Malzen, konnten die angestrebten Verbesserungen ebenfalls nicht erreicht werden.

In einer weiteren Reihe von sieben Suden stellten die Zusammensetzung der Schüttung, die dosierte Enzymmenge und die Art des Maischverfahrens die Versuchsvariablen dar, wie aus der folgenden Versuchsanstellung hervorgeht :

Sud	*Schüttung* (%)	*Zusatz von Brew-N-Zyme BR* (%)	*Maischverfahren*
A'' (Vergleich)	Pilsnermalz 85 Maisgriess 15	Dekoktions-Einmaisch-Verfahren « Standard »	
B''	Pilsnermalz 25 Gerste 60 Maisgriess 15	Dekoktions-Einmaisch-Verfahren « Standard »	0,075 (1)
C''	Pilsnermalz 25 Gerste 60 Maisgriess 15	Dekoktions-Einmaisch-Verfahren « Standard »	0,100 (1)
D''	Pilsnermalz 25 Gerste 60 Maisgriess 15	Dekoktions-Einmaisch-Verfahren « Spezial »	0,075 (1)
E''	Pilsnermalz 25 Gerste 75	Infusions-Maisch-Verfahren « Spezial »	0,075 (1)
F''	Pilsnermalz 25 Gerste 75	Infusions-Maisch-Verfahren « Standard »	0,075 (1)
G'' (2)	Pilsnermalz 25 Gerste 75	Infusions-Maisch-Verfahren « Standard »	0,100 (1)

In allen Fällen wurde mit einer Weichtemperatur von 45° gearbeitet, da sich diese bei anderen Versuchen als optimal erwiesen hatte (27). Eine Temperatur von 45° hielten wir sowohl bei den Dekoktions-Einmaisch-Verfahren in den Restmaischen als auch bei den Infusions-Verfahren während der ersten Rast ein. Die aus einer Schüttung von 25 p. 100 Malz, 60 p. 100 Gerste und 15 p. 100 Maisgriess nach dem bereits früher skizzierten Dekoktions-Einmaisch-Verfahren unter Zugabe von 0,075 p. 100 (Sud B'') bzw. 0,1 p. 100 (Sud C'') Brew-N-Zyme erzeugten Würzen und Biere unterschieden sich in allen analytischen Merkmalen nur unwesentlich voneinander, wie aus den Tabellen 7 und 8 zu erkennen ist. Die Modifikation des Maischverfahrens mit Verkürzung der 90 minütigen Maltoserast bei 63° zugunsten zweier zusätzlicher Rasten von 20 mn bei 58° und 15 mn bei 67° (Sud D'') ergab eine Würze mit niedrigeren Gehalten an vergärbaren Zuckern, mittel- und niedermolekularen Stickstoffverbindungen sowie ein Bier mit einer eher schlechteren Schaumhaltbarkeit. Mit dem Ersatz der Schüttung an Maisgriess durch eine Erhöhung des Gerstenanteils auf 75 p. 100 konnten wir ein Infusionsverfahren anwenden, das durch Rasten von

(1) Bezogen auf den Rohfruchtanteil.
(2) Nur bis zur Anstellwürze geführt.

60 mn bei 45°, 90 mn bei 75° charakterisiert war (Sud F''). Dadurch gelang es, den Gehalt von Würze und Bier an Gesamtstickstoff anzuheben, wobei auch die α-Aminostickstoff-Konzentration der Würze anstieg und den Wert des Vergleichssudes fast erreichte. Wie die entsprechenden Analysen zeigten, wirkte sich der Zusatz einer grösseren Menge an Brew-N-Zyme (Sud G'') — 0,1 p. 100 statt 0,075 p. 100 — nur wenig erhöhend auf die Gehalte der Würze an vergärbaren Zuckern, Gesamt- und α-Aminostickstoff aus. Führte man auch innerhalb des Infusionsverfahrens zwei neue Rasten von 20 mn bei 58° und 15 mn bei 67° unter Reduktion der 90 minütigen Maltoserast bei 63° ein (Sud E''), so war in den Würzen und Bieren zwar eine geringfügige Zunahme des Gesamt- und α-Aminostickstoffgehaltes, andererseits jedoch ein niedrigerer Endvergärungsgrad festzustellen.

TABELLE 7

Anstellwürzen aus der zweiten Reihe von Brauversuchen

Sud	A''	B''	C''	D''	E''	F''	G''
Verzuckerung	jod-normal	jod-normal	jod-normal	jod-normal	jod-normal	jod-normal	jod-normal
Extrakt (Gew. %)	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,1
Reduz. Zucker (1) (Gew. %)	9,4	8,8	8,4	8,3	8,2	8,2	8,9
Endvergärungsgrad scheinbar (%)	89,0	83,2	82,3	78,9	78,9	82,1	83,8
Farbe (EBC-Einh.)	13,5	9,7	9,5	10,5	15,5	12,0	13,5
Gesamtstickstoff (mg/100 g) (2)	85,2	72,9	75,0	72,3	92,6	88,5	92,9
Lundin-Fraktion A (%)	23,9	29,8	29,3	32,4	30,5	31,6	28,7
Lundin-Fraktion B (%)	16,4	18,5	16,9	16,6	20,8	18,3	18,9
Lundin-Fraktion C (%)	59,7	51,7	53,8	51,0	48,7	50,1	52,6
Koagul. Stickstoff (mg/100 g) (2)	2,0	2,4	2,2	3,2	3,8	4,9	3,1
α-Aminostickstoff (3) (mgl) (2)	215	154	154	143	211	199	211
Trubgehalt (4) (mg/l) (2)/	185	150	163	161	150	156	146
Anthocyanogene (5) (E 546 nm)	0,26	0,20	0,21	0,19	0,21	0,21	0,21
Bitterstoffe (BE)	29	33	35	34	31	33	35

(1) Bestimmt nach POTTERAT-ESCHMANN.
(2) Auf 12 p. 100 berechnet.
(3) Bestimmt mit TNBS-Reagens, Eichkurve mit Glycin aufgenommen.
(4) Bestimmt nach NARZISS und MIEDANER (bei + 2°C).
(5) Bestimmt nach HARRIS und RICKETTS.

Die besprochenen Resultate geben einen Eindruck der analytischen Eigenschaften der erzeugten « Gerstenwürzen » gegenüber den Vergleichswürzen. Daraus ist ersichtlich dass ihr Farbgrad und die Gehalte an vergärbaren und reduzierenden Zuckern etwas niedriger ausfielen. Dank einer besseren Ausnützung des stets in gleicher Menge dosierten Hopfenextraktes wiesen die « Gerstenwürzen » aber einen um ungefähr 15 p. 100 höheren Bitterwert auf. Sie enthielten 25 p. 100 weniger Kühltrub. Der pH-Wert lag meist etwas höher. Was die Stickstoffverhältnisse betrifft, so war bei einem niedrigeren Gesamtstickstoffgehalt ein grösserer Anteil an

Proteinen und eine geringere Konzentration an niedermolekularen Stickstoffverbindungen zu bestimmen.

Die bei den « Gerstenbieren » gegenüber den Vergleichsbieren beobachteten Unterschiede geben einen der Würze ähnliches Bild.

TABELLE 8

Ausstossbiere aus der zweiten Reihe von Brauversuchen

Sud	A″	B″	C″	D″	E″	F″
Stammwürze (Gew. %)	12,1	12,2	12,0	12,3	12,1	12,2
Alkohol (Gew. %)	4,31	4,17	3,87	3,95	3,92	4,06
Exrtakt scheinbar (Gew. %)	1,79	2,24	2,76	2,87	2,73	2,57
Extrakt wirklich (Gew. %)	3,73	4,13	4,49	4,64	4,48	4,40
Vergärungsgrad (Vs) (%)	85,2	81,6	77,0	76,6	77,4	79,0
Endvergärungsgrad (EVs) (%)	90,0	83,5	83,5	80,2	80,1	83,5
Farbe (EBC-Einh.)	8,25	7,25	6,75	7,25	8,75	9,00
pH	4,70	4,65	4,80	4,80	4,90	4,85
Schaumziffer [1]	109	112	111	106	116	117
Gesamtstickstoff (mg/100 g) [2]	72,2	55,0	61,9	55,2	73,0	76,9
Koagul. Stickstoff (mg/100 g) [2]	2,7	2,3	2,4	2,1	3,2	3,1
Lundin-Fraktion A (%)	19,4	28,7	28,9	32,1	29,7	15,7
Lundin-Fraktion B (%)	19,9	25,4	20,4	22,3	21,0	34,7
Lundin-Fraktion C (%)	60,7	45,9	50,7	45,6	49,3	49,6
α-Aminostickstoff [3] (mg/l) [2]	152	73	100	77	129	123
Anthocyanogene [4] (E 546 nm)	0,17	0,12	0,12	0,11	0,13	0,13
Bitterstoffe (BE)	22	23	22	24	23	24
Diacetyl [5] (mg/l)	0,05	0,02	0,03	0,05	0,03	0,04
2,3-Pentandion [5] (mg/l)	0,04	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02

([1]) Bestimmt nach Ross und Clark.
([2]) Auf 12 p. 100 Stammwürze berechnet.
([3]) Bestimmt mittels TNBS-Reagens, Eichkurve mit Glycin aufgenommen.
([4]) Bestimmt nach Harris und Ricketts.
([5]) Gaschromatographisch bestimmt.

Bezüglich der wichtigsten Qualitätskriterien war bei den « Gerstenbieren » neben einer helleren Farbe und einem höheren Bitterstoffgehalt auch eine bessere Schaumhaltbarkeit und Kältestabilität festzustellen. Sie enthielten teils etwas mehr teils sogar auch weniger Diacetyl und Pentandion-(2,3) als die Vergleichsbiere, wobei die gaschromatographisch bestimmten Werte (23) aber in allen Fällen weit unter den entsprechenden Geschmacksschwellen lagen. Die im Ausstossbier nachzuweisende Menge an vicinalen Diketonen scheint vom Verlauf der Nachgärung wesentlich stärker beeinflusst zu werden als durch den α-Aminostickstoffgehalt der Würze (16-28). Bei den Kostproben hinterliessen die mit einem hohen Schüttungsanteil von Gerste und mit Brew-N-Zyme hergestellten Biere einen recht guten Eindruck, auch gegenüber der Vergleichsbieren.

Weitere in dem Pilot-Plant durchgeführte Versuche haben ferner gezeigt, dass sich die Nassschrotung in Kombination mit dem Einsatz von Brew-N-Zyme auch

zur Herstellung von Gerstensirup gut eignet. In einer derartigen Versuchsreihe wurde beispielsweise die Schüttung wie folgt variiert :

Sud	*Schüttung* (%)	*Zusatz von Brew-N-Zyme BR* (1) (%)
A''' (Vergleich)	Malz 100	
B'''	Malz 15	
	Gerste 85	0,075
C'''	Malz 10	
	Gerste 90	0,075
D'''	Malz 5	
	Gerste 95	0,075

Gemaischt wurde nach dem bei den Brauversuchen bereits beschriebenen Infusionsverfahren « Standard ». Die normal abgeläuterten Würzen erfuhren in einem Dünnschichtverdampfer eine Konzentrierung auf 80 p. 100 Trockensubstanz. Wie eingehende Untersuchungen der so erzeugten Gerstensirupe ergaben, entsprachen deren analytische Merkmale den in der Literatur angegebenen vergleichten (29). Der Malzextrakt (A''') unterschied sich von den Gerstensirupen (B''', C''' und D''') insbesondere hinsichtlich der Kohlenhydratzusammensetzung. Letztere wurde nach Silylierung der Zucker gaschromatographisch bestimmt (30). In Tabelle 9 sind als repräsentative Beispiele die Kohlenhydratanalysen des Malzextraktes

TABELLE 9

Kohlenhydratzusammensetzung von Malzextrakt und Gerstensirup

Probe	Malzextrakt A''' (g/100 g TS) (1)	Gerstensirup C''' (g/100 g TS) (1)
Fruktose	1,3	0,7
Glukose	10,2	4,1
Saccharose	1,2	0,5
Maltose	52,0	56,8
Maltotriose	16,7	13,2

(1) Trockensubstanz.

(A''') und eines Gerstensirups (C''') zusammengestellt. Daraus ist ersichtlich, dass letzterer bedeutend weniger Fruktose, Glukose und Saccharose, dafür aber mehr Maltose enthält. Hexosen und Saccharose sind präexistierende Zucker der Gerste und werden zusätzlich während dem Mälzen gebildet. Die im Malzextrakt gegenüber

(1) Bezogen auf den Rohfruchtanteil.

Gerstensirup höheren Gehalte an derartigen Kohlenhydraten dürften im wesentlichen auf das Vorhandensein dieser Zucker im Malz und nicht auf eine Bildung während dem Maischprozess zurückzuführen sein.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Aufgrund der beschriebenen Versuche kann man sagen, dass sich Gerste mit Hilfe von Brew-N-Zyme gut verarbeiten lässt. Hierzu bietet sich die Nassschrotung als äusserst nützliches Verfahren an. Die optimale Arbeitsweise besteht in einem vorgängigen Weichen von 20 mn bei 45°. Im übrigen scheint die Zusammensetzung der Schüttung einen viel grösseren Einfluss auf die Beschaffenheit der Würze auszuüben als eine höhere Zugabe von Brew-N-Zyme oder eine Anderung des Maischprozesses. Dieser dauerte bei den Gerstensuden unter Anwendung von Infusionsoder Dekoktions-Einmaisch-Verfahren nicht länger als in den Vergleichssuden. Dasselbe galt für den Läuterprozess. Auch die Haupt- und Nachgärung verlief bei den verschiedenen Ansätzen durchaus normal. Die zukünftige Entwicklungsarbeit wird auf eine noch weitergehende Erhöhung und Optimalisierung der Gehalte an vergärbaren Zuckern und α-Aminostickstoff abzielen. Entscheidend für die Einführung dieser neuartigen Technologie der Rohfruchtverarbeitung mit Brew-N-Zyme dürfte neben den qualitativen Aspekten aber nicht zuletzt auch deren wirtschaftliche Seite sein.

RÉSUMÉ

TECHNOLOGIE DU BRASSAGE AVEC DES GRAINS CRUS ET DES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES INDUSTRIELLES

A la brasserie-pilote de l''Institut (Versuchsstation Schweizerischer Brauereien, Zurich), nous avons testé, en combinaison avec du maïs, l'effet de l'orge crue additionnée de préparations enzymatiques à la place du malt traditionnel. En relation avec le concassage humide, nous avons fait des essais préliminaires concernant l'absorption d'eau de l'orge par rapport au temps et à la température de la trempe. En plus, nous avons étudié, avant le concassage, l'influence de deux degrés de trempage extrêmes sur la désagrégation du grain respectivement sur le rendement et la qualité du moût.

Par deux séries d'essais, nous avons établi comparativement à des brassins composés de 85 p. 100 de malt et de 15 p. 100 de maïs, en quelle mesure le remplacement du malt par 70 p. 100 d'orge crue et l'addition de préparations Brew-N-Zyme se répercutent sur la qualité des bières ainsi obtenues. Poursuivant nos brassins d'essais, nous avons également remplacé la proportion initiale de maïs par de l'orge et varié la composition du versement de malt de même que les diagrammes de brassage.

Les essais ont montré que, combinée avec le concassage humide, l'orge se laisse facilement brasser. Les conditions optimum de trempage ont été constatées pour une température de 45° et une durée de 20 min.

Le brassage de 75 p. 100 de grains crus (60 p. 100 d'orge et 15 p. 100 de maïs, ou bien de 75 p. 100 d'orge) et de 25 p. 100 de malt additionnés d'enzymes, ne durait pas plus longtemps qu'un brassage classique aussi bien en infusion qu'en décoction. Nous avons fait la même constatation pour la filtration. Enfin, les fermentations principales et secondaires se déroulaient normalement.

Tous les moûts et toutes les bières ainsi obtenus ont été analysés avec les plus grands soins et suivant les méthodes les plus modernes. Les résultats sont discutés en détail. En ce qui concerne les caractéristiques essentielles de qualité, notons que les bières à base d'orge crue présentent une couleur plus claire, une meilleure tenue de la mousse et une meilleure stabilité au froid. Par suite d'une meilleure assimilation de l'extrait de houblon, additionné chaque fois en quantités identiques, les bières d'essais avaient une plus forte teneur en principes amers. Lors des dégustations, les bières fabriquées avec de l'orge crue et des enzymes firent une très bonne impression.

SUMMARY

THE TECHNOLOGY OF BREWING WITH ADJUNCTS AND INDUSTRIAL ENZYME PREPARATIONS

The addition of unmalted barley and enzyme preparations in place of a portion of the malt was examined along with the use of maize during brewing in the semi-scale pilot brewery of the Versuchsstation der Schweizerischen Brauereien (Zürich). In conjunction with wet milling, the uptake of water by the barley in relation to steeping time and temperature was examined in brewing trials. In addition the effect of two extreme moisture contents of the barley before crushing on the physical conversion of the grain and on the yield and quality of the resulting wort was investigated. In two series of main trials comparison was made between brews prepared using 85 p. 100 of malt and 15 p. 100 maize and those in which 70 p. 100 of the malt was replaced by raw barley and different types of Brew-N-Zyme preparations to determine the effects of these materials on beer quality. In addition, the maize was replaced by barley, the composition of the malt grist and the mashing procedure were varied.

Results of the trials revealed that brewing can be carried out with barley when wet milling is employed. Optimum steeping conditions were a temperature of 45° for a period of 20 mn. The employment of 75 p. 100 adjuncts (60 p. 100 barley and 15 p. 100 maize or 75 p. 100 barley) with 25 p. 100 malt and added enzyme both in the infusion and in the one-mash decoction procedures required no more time than the control brew. This applied also to the lautering process. The main and secondary fermentations proceeded normally throughout in the individual brews.

Collectively the worts and beers produced were given thorough examination by current methods of analysis and the results are described in detail. The most important conclusion concerns the quality of the beers prepared using barley. These had paler colours, better head retention and chill stability than controls. Besides the improved utilisation of bitter substances obtained using hop extracts, these trial beers also showed significantly higher contents of bitter substances. In the taste trials the beers brewed with a high proportion of barley and Brew-N-Zyme created a very good impression.

LITERATUR

(1) Beubler A., Dempwolf M., Nielebock C., 1968. *Proc. II. Int. Symp. Gärungsindustr.*, Leipzig, Bd. 1.1., S. 175.

(2) Dempwolf M., Ehlies H., Müller-Freymuth H., 1968. *Proc. II. Int. Symp. Gärungsindustr.* Leipzig, Bd. 1.1, S. 295.

(3) Dickscheit R., 1968. *Proc. II. Int. Symp. Gärungsindustr.*, Leipzig, Bd. 1.1, S. 5.

(4) Holló J., László E., 1970. *Stärke*, **22**, 265.

(5) Klopper W. J., 1967-68. *Int. Tijdschr. Brouwerij en Mouterij*, **27**, 143.

(6) Klopper W. J., 1968. *Brauereitechniker*, **20**, 1.

(7) Klopper W. J., 1969. *Brauwelt*, **109**, 753.

(8) Klopper W. J., 1969. *Brass. Malt. Europe*, **19**, 295.

(9) Macey A., Stowell K. C., White H. B., 1968. *European Brewery Con., Proc. Congr. 11th* Madrid, 1967, Elsevier, Amsterdam, S. 283.

(10) Mercier P. M., 1971. *Brass. Malt. Europe*, **21**, 33.

(11) Püspök J., 1971. *Mitt. Versst. Gärungsgew.* Wien, **25**, 15.
(12) Saletan L. T., 1968. *Wall. Lab. Comm.*, **31**, 33.
(13) Sörensen S. A., 1970. *Proc. Biochem.*, **5**, 60.
(14) Sörensen S. A., 1970. *Brygmesteren*, **27**, 61.
(15) Schur F., Ullmann F., Schlienger E., Pfenninger H., 1968. *Brauwiss.*, **21**, 413.
(16) Vermeire H. A., 1969-70. *Int. Tijdschr. Brouwerij en Mouterij*, **29**, 66.
(17) Wieg A. J., Hóllo J., Varga P., 1969. *Proc. Biochem.*, **4**, 33.
(18) Wieg A. J., 1969. *Brew. Digest*, **44**, (July) 56.
(19) Wieg A. J., (June 1969). *Modern Brew. Age*, **79**, 44.
(20) Wieg A. J., 1969. *Naarden Nachrichten*, Nr. **204**, 5.
(21) Wieg A. J., 1970. *Brass. Malt. Europe*, **20**, 168.
(22) Wieg A. J., 1970. *Mitt. Versst. Gärungsgew. Wien*, **24**, 171.
(23) Witt P. R., 1970. *Brew. Digest*, **45** (February), 48.
(24) Witt P. R., Banasik O. J., 1970. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, S. 134.
(25) Wieg A. J., 1970. *Stärke*, **22**, 200.
(26) Pfenninger H., Schlienger E., Ullmann F., Schur F., 1970. *Schweiz. Brauerei-Rdsch.*, **81**, 69.
(27) Wieg A. J., 1970. *Proc. Biochem.*, **5**, 46.
(28) Scherrer A., 1971. *Schweiz. Brauerei-Rdsch.*, **82**, 21.
(29) Maule A. P., Greenschilds R. N., 1970. *Proc. Biochem.*, **5**, 39.
(30) Clapperton J.-F., Holliday A. G., 1968. *J. Inst. Brew.*, **74**, 164.
(31) Holló J., László E., Tóth M., Wieg A. J., october 1971. Lecture, *4th Europian Symp. Food Process, Eroup. Fed. Chem. Eng.*, Frankfurt.
(32) Pfenninger H. B., Schur F., Wieg A. J., E. B. C., *Proc. 13th. Congr.*, Estoril. May 1971.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 335-341.

LA STABILISATION DE LA BIÈRE PAR L'ADDITION D'ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

J. DE CLERCK

Faculté des Sciences agronomiques
Université catholique de Louvain (Belgique)

RÉSUMÉ

Les enzymes protéolytiques ont été les premiers stabilisateurs de la bière. Un brevet en avait été créé en 1911. Ils sont encore actuellement les plus répandus.

Leur rôle dans la stabilisation est de dédoubler les matières complexes, qui engendrent du trouble.

On a longtemps cru que la stabilisation était due uniquement à ce dédoublement, mais on a constaté que les tanins (ou polyphénols) de la bière jouent un grand rôle dans la formation du trouble, parce qu'en se combinant aux matières azotées ils en provoquent la précipitation.

Cette précipitation par les tanins forme plus de trouble que les matières azotées seules et est donc un facteur plus important.

Les tanins sont surtout importants lorsqu'ils sont polymérisés ou oxydés.

En dehors des facteurs « matières azotées » et « tanins », il faut aussi considérer la dose d'enzymes à ajouter, car un excès d'enzymes augmente le trouble. Cela est dû au fait que les enzymes sont elles-mêmes des protéines.

Et enfin nous avons aussi expérimenté quelle serait la phase de la fabrication qui donne la meilleure stabilisation.

INTRODUCTION

En 1911 on avait breveté, en Amérique, la stabilisation de la bière par l'addition d'enzymes protéolytiques. Cette méthode de stabilisation n'a fait que progresser, à tel point qu'actuellement presque toutes les brasseries du monde ajoutent des enzymes protéolytiques à leur bière. On se heurte cependant à des difficultés avec cette méthode. Toutes les bières ne donnent pas la même stabilisation, loin de là. Les résultats sont même confus.

A la demande du « Centre technique et scientifique de la Brasserie, de la Malterie et des Industries connexes belges » (en abrégé C. B. M.) nous avons entrepris, depuis plusieurs années, d'étudier, à la Section de Brasserie de notre Faculté, les meilleures conditions de l'utilisation des enzymes protéolytiques pour stabiliser la bière.

INFLUENCE DES POLYPHÉNOLS SUR LA STABILISATION DE LA BIÈRE PAR LES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

Lorsqu'on a commencé, en 1911, à ajouter des enzymes protéolytiques à la bière on pensait que la stabilisation était simplement due au dédoublement des polypeptides complexes, qui sont les agents de la formation du trouble. Mais la bière contient toujours des polyphénols (ou tanins, ou tannoïdes) qui proviennent en partie de l'orge et en partie du houblon. Or les polyphénols précipitent les polypeptides et engendrent ainsi du trouble. L'addition d'enzymes protéolytiques améliore quand même la stabilisation, mais elle est fortement contrariée par la présence des polyphénols, comme nous le verrons plus loin.

Le premier auteur qui avait étudié l'influence des polyphénols était Hartong (1), mais il n'avait pas pu en obtenir de résultats significatifs parce que les méthodes de dosage étaient très imprécises à cette époque. Chapon et ses collaborateurs (2 et 3) ont élaboré des méthodes plus précises, qui ont donné des résultats beaucoup plus significatifs sur l'influence des polyphénols. Il a constaté qu'il y avait une très nette corrélation entre la teneur en polyphénols et la sensibilité aux troubles.

On doit donc admettre que l'addition d'enzymes protéolytiques ne suffit pas, à elle seule, à stabiliser la bière. L'interférence des polyphénols limite donc l'action des enzymes.

Pour voir jusqu'à quel point la teneur en polyphénols agit sur la stabilité de la bière, nous avons pris des bières de notre brasserie expérimentale, toujours les mêmes, mais dont on a diminué progressivement la teneur en polyphénols. La diminution était faite par un adsorbant spécifique des polyphénols : la polyvinyl-pyrrolidone en poudre, dont le nom commercial est : Polyclar AT.

Le tableau 1 donne les résultats que nous avons obtenus.

On voit dans ce tableau que la durée de stabilisation est plus ou moins proportionnelle jusqu'à une teneur en polyphénols de 90 mg/l. Les teneurs de 77 et 64 mg/l donnent déjà une stabilité nettement plus longue et les très faibles teneurs donnent une stabilité très longue.

Si les taux élevés en polyphénols donnent une durée de stabilité assez faible, alors que les taux bas donnent une très longue stabilité, cela ne veut pas dire que les taux bas sont insuffisants pour former un trouble, mais que les derniers taux sont d'une autre nature que les premiers. Il y a, en effet, de nombreux polyphénols différents dans la bière et certains d'entre eux ont une capacité plus forte de former des troubles que d'autres. Comme il serait très difficile de mesurer individuellement les différents polyphénols de la bière, ce qui n'est d'ailleurs pas encore

faisable actuellement, il faut bien qu'on se fie à la teneur totale en polyphénols.

Pour mieux clarifier les résultats du tableau I, voici un diagramme de la durée de stabilité des différentes doses de polyphénols (fig. 1).

TABLEAU I

Élimination des polyphénols

		Teneur en polyphénols (mg/l)	Durée de stabilité en jours après conservation à 40°C
Bière telle quelle (témoin)		157	0
avec AT (g/l)	0,5	144	2,5
	1	130	4
	1,5	117	4,5
	2,0	104	7,5
	2,5	90	10,5
	3,0	77	15,5
	3,5	64	29
	4,0	51	157
	4,5	37	200
	5,0	24	275

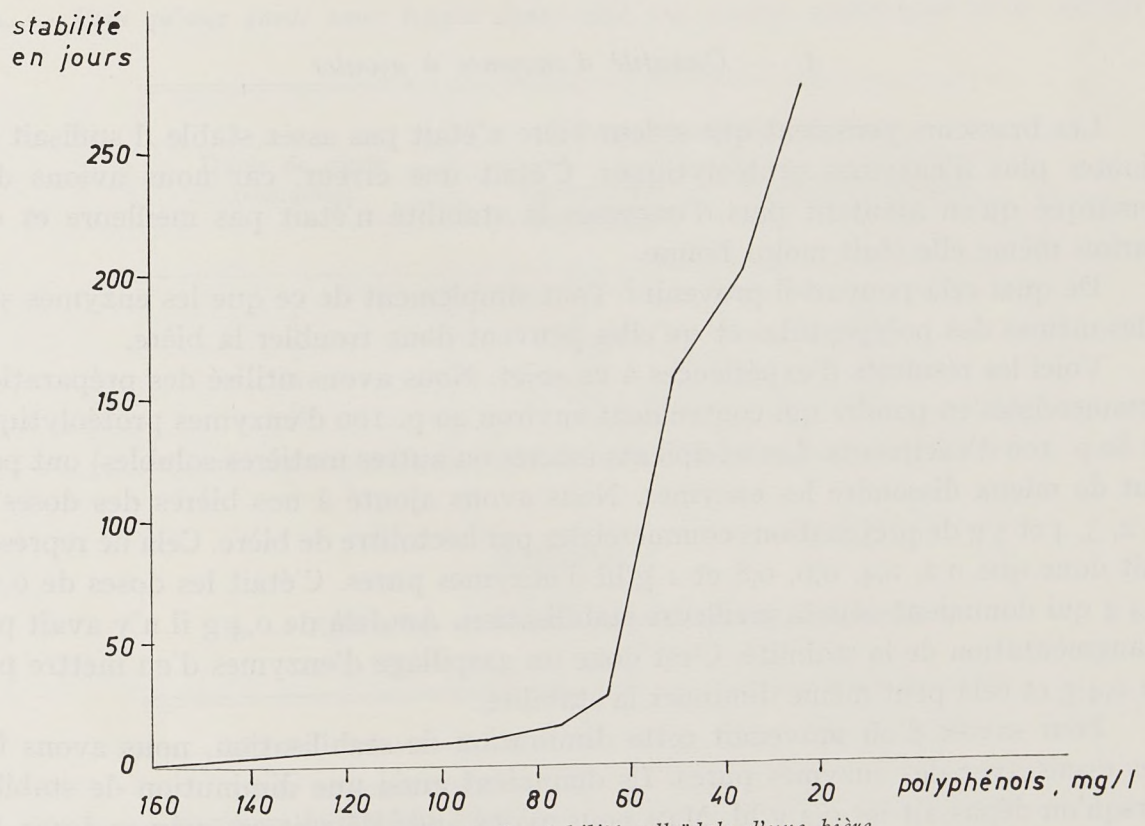


FIG. 1. — *Durée de stabilité colloïdale d'une bière en fonction de sa teneur en polyphénols*

L'ACTION DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES SUR LA STABILISATION DE LA BIÈRE

Jusqu'à présent nous n'avons encore étudié que l'influence des polyphénols sur la stabilité, ou plutôt l'instabilité de la bière. Il s'agit maintenant de déterminer dans quelle mesure l'addition d'enzymes protéolytiques peut stabiliser la bière, malgré les polyphénols qu'elle contient.

Comme différentes bières peuvent contenir des taux très différents de polyphénols, il est difficile d'obtenir des résultats uniformes dans les expériences sur l'addition des enzymes protéolytiques. Pour avoir des résultats plus précis nous avons fait la plupart de ces expériences avec des bières de notre brasserie expérimentale, qui est conçue de telle façon que les brassins donnent toujours des bières identiques. Les dosages des enzymes protéolytiques ont été faits par la méthode de SCHULZE BERNDT (4).

Voyons maintenant dans quelle mesure l'addition d'enzymes peut améliorer la stabilité de la bière. Tout d'abord il ne faut pas croire qu'en ajoutant plus d'enzymes on aura une meilleure stabilisation. C'est même le contraire comme nous allons le voir. En second lieu, l'action des enzymes est d'autant plus efficace que la bière elle-même est déjà plus stable. Et en troisième lieu, les enzymes sont absorbées en grande partie par la filtration de la bière.

Voyons donc en détail ces trois facteurs.

1. — *Quantité d'enzymes à ajouter*

Les brasseurs pensaient que si leur bière n'était pas assez stable il suffisait d'y ajouter plus d'enzymes protéolytiques. C'était une erreur, car nous avions déjà remarqué qu'en ajoutant plus d'enzymes la stabilité n'était pas meilleure et que parfois même elle était moins bonne.

De quoi cela pouvait-il provenir ? Tout simplement de ce que les enzymes sont elles-mêmes des polypeptides et qu'elles peuvent donc troubler la bière.

Voici les résultats d'expériences à ce sujet. Nous avons utilisé des préparations commerciales en poudre qui contenaient environ 20 p. 100 d'enzymes protéolytiques et 80 p. 100 d'excipients. Les excipients (sucres ou autres matières solubles) ont pour but de mieux dissoudre les enzymes. Nous avons ajouté à nos bières des doses de 1, 2, 3, 4 et 5 g de préparations commerciales par hectolitre de bière. Cela ne représentait donc que 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 g/hl d'enzymes pures. C'était les doses de 0,2 à 0,4 g qui donnaient déjà la meilleure stabilisation. Au-delà de 0,4 g il n'y avait plus d'augmentation de la stabilité. C'est donc un gaspillage d'enzymes d'en mettre plus de 0,4 g et cela peut même diminuer la stabilité.

Pour savoir d'où provenait cette diminution de stabilisation, nous avons fait des essais avec des enzymes pures. Ils donnaient aussi une diminution de stabilité lorsqu'on dépassait les 0,4 g/hl. Mais nous avons aussi détruit ces mêmes doses. On ne pouvait pas les détruire par l'ébullition, car elles se seraient coagulées. On les a dé-

truites par une addition d'acide iodo-acétique. Il se formait alors très rapidement un trouble dans la bière.

On peut donc conclure que la cause d'une diminution de stabilité par un excès d'enzymes est bien due à leur nature polypeptidique.

2. — *Influence de la préstabilisation de la bière*

Il y a évidemment bien d'autres méthodes de stabilisation de la bière que l'addition d'enzymes protéolytiques. Pour ne citer que les méthodes les plus courantes, ce sont :

1° L'addition de réducteurs, notamment de l'acide ascorbique ou du SO_2.

Cette addition de *réducteurs* a pour but d'éviter l'oxydation de la bière. Ceci est très important, car les polyphénols oxydés sont beaucoup plus dangereux pour la stabilité et en outre pour l'arôme et le goût de la bière.

2° L'addition de bentonites ou de silicagels, qui adsorbent les polypeptides complexes.

3° La précipitation des polypeptides complexes par le tanin gallique.

4° L'adsorption des polyphénols par l'adsorbant Polyclar AT.

Nous avons étudié l'effet de l'addition des enzymes protéolytiques sur les bières déjà préstabilisées par les méthodes citées ci-dessus. Leur effet est considérable (tabl. 2, 3, 4 et 5).

TABLEAU 2

a. — *Rien qu'une garde assez longue donne déjà une notable amélioration de la stabilité*

Durée de garde (semaines)	Durée de stabilité en jours	
	sans ajouter d'enzymes	avec 0,2 à 0,4 g/hl d'enzymes
1	1	21
2	2,5	25
3	3	32
4	3,5	32

TABLEAU 3

b. — *Effet d'un traitement préalable par les bentonites*

Addition d'enzymes (g/hl)	0	0,2	0,4	0,6
Durée de conservation (moyenne de plusieurs bières) (j)	10	66	86	134

TABLEAU 4

c. — *Effet d'un traitement préalable par précipitation au tanin gallique*

Addition d'enzymes commerciales (g/hl)	0	0,2	0,4	0,6
Durée de conservation (j) (moyenne de deux bières)	54	74	110	113

TABLEAU 5

d. — *Effet d'un traitement par le Polyclar A. T.*

Dose ajoutée (g/hl)	Sans enzymes	Avec 0,2 g d'enzymes
0	—	21
14	—	88
28	42	121

Ces expériences montrent que des bières déjà préstabilisées donnent une très longue stabilité lorsqu'on y ajoute un peu d'enzymes.

3. — *Absorption des enzymes à la filtration de la bière*

C'est un peu par hasard que nous avions constaté au laboratoire qu'une simple filtration de la bière sur un papier-filtre avait absorbé 20 p. 100 des enzymes ajoutées. Nous avons alors pris des échantillons avant et après la filtration dans une brasserie. On y filtrait d'abord sur un filtre à cartons. Avec le kieselguhr il y avait déjà une perte de 45 p. 100 et avec les cartons elle augmentait encore de 14 p. 100.

Une autre brasserie se plaignait de ce que sa bière était très instable nonobstant l'addition d'enzymes protéolytiques. Mais elle filtrait sa bière sur un filtre en cartons stérilisants, qui ont un très grand pouvoir d'adsorption. A l'analyse, la bière ainsi filtrée ne contenait plus du tout d'enzymes! Il faut donc ajouter les enzymes *après la filtration*, ce qui se fait facilement maintenant avec les enzymes en solution.

CONCLUSIONS

Pour avoir de bons résultats avec l'addition d'enzymes protéolytiques pour stabiliser la bière il faut :

1° ne pas dépasser 0,4 g d'enzymes pures,

2° ne les ajouter qu'après la filtration,

3° préstabiliser déjà la bière si on veut avoir une très longue durée de stabilité.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes collaborateurs de ces travaux, l'ingénieur E. Moerman et le docteur R. Vancraenenbroeck, tous deux ingénieurs chimistes et des Industries agricoles. J'y joins également mon collègue le professeur R. Lontie et ses assistants, qui nous ont maintes fois secondés de leurs conseils.

SUMMARY

ENZYMES AND THE STABILIZATION OF BEERS

Proteolytic enzymes were the first stabilizers of beer. A patent was granted in 1911. At the present time, they are still the most widely used.

Their role in stabilization is the splitting up of complex substances which cause turbidness.

For a long time it was held that stabilization was due solely to this splitting up, but it has been established that the tannins (or polyphenols) of beer play a large role in the formation of turbidness by combining with and bringing about the precipitation of nitrogenous matter.

This precipitation by tannins forms more turbidness than do nitrogenous matters alone and is therefore a more important factor.

Tannins are especially important when polymerized or oxidized.

Besides the factors of « nitrogenous matters » and « tannins », the dose of enzymes to be added must also be considered, as an excess of enzymes augments turbidness. This is due to the fact that the enzymes are themselves proteins.

Finally, we have also made experiments concerning the manufacturing phase for best stabilization.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE ENZYME BEI DER BIERSTABILISIERUNG

Die proteolytischen Enzyme waren die ersten Stabilisatoren. Im Jahre 1911 wurde ein Patent veröffentlicht. Sie sind zurzeit noch die verbreitetsten.

Ihre Stabilisierungsrolle ist, die komplexen Stoffe, die Trübung hervorbringen, zu verdoppeln.

Man hat lange geglaubt, dass die Stabilisierung allein durch diese Verdoppelung verursacht wurde ; man hat jedoch festgestellt, dass die Biertannine (oder Polyphenole) eine wichtige Rolle in der Trübungsformation spielen, weil sie, indem sie sich mit stickstoffhaltigen Stoffen vereinigen, den Niederschlag bewirken.

Dieser Niederschlag durch die Tannine bildet mehr Trübung als die stickstoffhaltigen Stoffe allein und ist somit ein wichtigerer Faktor.

Die Tannine sind besonders wichtig, wenn sie polymerisiert oder oxydiert werden.

Abgesehen von den Faktoren « stickstoffhaltige Stoffe » und « Tannine » muss man auch die zugesetzte Enzymdosis betrachten, weil ein Enzymüberschuss die Trübung vermehrt, denn die Enzyme sind selbst Proteine.

Abschliessend hat man auch untersucht, welche Fabrikationphase die beste Stabilisierung ergibt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Hartong B. D., 1929. *Wochenschrift für Brauerei*, **46**, 543.

(2) Chapon L., 1961. *Revue des Fermentations et des Industries alimentaires*, **16**, 169.

(3) Chapon L., Chapon S., Chemardin M., Kretschmer K. F., 1969. 12e *Congrès de l'European Brewery Convention, Interlaken*, p. 173.

(4) Schulze-Berndt H. G., 1955. *Dissertation Techn. Universität Berlin*, n° 43.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 343-356.

LACTASE — TREATMENT IN THE DAIRY INDUSTRY

Dr. Ch. C. J. OLLING

Coöp. Condensfabriek « Friesland »,
Leeuwarden (Holland)

SUMMARY

In recent medical publications lactose-intolerance has been published very often. In most of these experiments unphysiological high amounts of lactose were given. This lactose-intolerance is caused by the impotency of the intestine to secrete (enough of) the enzyme lactase since no undesirable effects were seen after the ingestion of an equivalent amount of glucose + galactose.

Although lactase deficiency is very often seen in developing countries, absolute absence of lactase activity is seldom observed. So a reasonable amount of milk, when given in several shares during the day, has shown to be tolerated by almost everybody. Only in the few cases of lactase absency a lactase treatment of the milk is needed (oral supplementation of these patients with lactase preparations were up to now unsuccessful).

For these patients we have developed a procedure by which over 99 p. 100 of the lactose is hydrolyzed into glucose and galactose. The progress of the lactose conversion is followed by a gaschromatographic procedure.

Since lactase activity has its optimum at 37°C, much attention should be paid to hygienic quality of both, milk and enzyme, as well as to equipment and handling during incubation. Otherwise the batch will be contaminated by microbiological growth. Process conditions are a compromise between digestion rate, amount of enzyme, risk for infections, incubation time and so on.

Glucose and galactose are more reactive than lactose, so this fermented milk is more sensitive. to heat-treatment, ; consequently colour, flavour and taste deteriorate more during sterilizing. The spray-dried product, however, is equal to normal spray-dried milkpowders, only the taste is somewhat sweeter. After dilution this fermented milk can be used just like normal milkpowder.

Up to now this fermented milk was accepted very well, both in lactase deficient infants and in adults with a dumping syndrome and in other cases of chronic diarrhoea.

Lactase treatment is also recommended in order to increase the total amount of whey solids which can be tolerated in animal feeds. It is, however, my opinion that this treatment is too expensive for this application. The same will hold for the lactase treatment of milk or whey powders to be used in the bakery industry.

Lactose crystallization during storage of sweetened condensed milk, frozen ice cream and so on can be prevented by a treatment of the milk with lactase. The formation of highly reactive monoses, however, will injure the quality of the sweetened condensed milk (non-enzymatic browning) ; moreover the sandyness due to the lactose crystallization can be prevented by seeding this product with small lactose crystalls. Crystal formation in ice cream can be retarded by addition of thickening agents.

Our conclusion is that lactase treatment is profitable only for the preparation of milk products for a restricted amount of patients with a severe lactase deficiency, either inborn or obtained later on. For these patients a high conversion of the lactose will be necessary.

INTRODUCTION

Lactase is an enzyme which is secreted by the mucosa of the intestine. This enzyme promotes the hydrolysis of lactose into glucose and galactose. Scientifically it is called beta-galactosidase.

In 1952 DEAN postulated that diarrhoea in African children — and particularly in kwashiorkor patients — may be caused by lactose. Since that paper, over 100 publications are devoted to lactose intolerance. It is not our intention to describe these in details, nor to recapitulate these experiments. Good reviews are given by HAEMMERLI c. s. (1965), TOWNLEY (1966) and ROSENSWEIG (1969). Also *Nutrition Reviews* paid attention to lactase deficiency.

Lactose intolerance and milk intolerance are generally associated since both are related to the unability of the intestine to secrete — enough — of the enzyme lactase to give a good digestion of the ingested lactose.

However, the phrase milk intolerance should be limited to the occurrence of symptoms, and signs after the consumption of milk. Such symptoms are vomitting bloating, abdominal cramps, flatulence and diarrhoea. This milk intolerance is generally not related to an allergic reaction against the milk proteins (BAYLESS c. s., 1967), but is caused by the ingestion of lactose. After oral administration of lactose, the same complaints as after milk consumption are often observed.

The phrase lactose intolerance should be used only in those cases whereafter oral loading, with high amounts of lactose, abnormal reactions can be observed by biochemical methods. The usual procedure is oral administration of 50 g of lactose after an overnight fast and venous blood sugar measurement 0, 30, 60 and 90 minutes after loading. Some investigators give up to 90 g of lactose ; in children 2 or 3 g per kg bodyweight are given. On an average, in healthy Europeans a blood sugar increase of 50 mg p. 100 or more is found. If this increase is less than 20 mg p. 100, lactose intolerance is diagnosted.

These quantities of lactose are very large in relation to those present in cow's milk, which contains only 45-50 g of lactose per liter. « Flat » lactose tolerance curves were observed in 80-100 p. 100 of adult Indians in North and South America, African — and American Negroes, Chinese in Australia and U. S. A., different ethnic Jewish groups and Arabs in Israel as well as Cypriots in England and Eskimoes both in Greenland and in Copenhagen (see table 1). Although the enzyme defect might be genetically determined (BAYLESS and ROSENSWEIG, 1966), there are no indications that the majority of normal sucklings should not tolerate lactose (HUANG and BAYLESS (1968), MCGILLIVRAY (1968)). So lactose intolerance must be developed later on.

In the western Caucasian race milk intolerance is very seldom observed. However, several investigators record lactose malabsorption in 10-15 p. 100 of the Europeans tested.

The high occurrence of lactase deficiency found in many races seems to be in contrast to the fact that these people do tolerate milk consumption (GIRARDET c.s., 1963 ; GILAT c.s., 1970 ; SUTEDJO, 1971 ; LUYKEN, 1971, 1972 ; SKALA, 1971).

TABLE I

Population groups with a high degree of lactase deficiency

		References
Indians	in U. S. A.	Welsh c.s. (1967)
Indians	in South America	Alzate c.s. (1969)
Indians	in Australia	Davis and Bollin (1967)
Negroes	in Africa	Cook and Lee (1966)
Negroes	in U. S. A.	Bayless and Rosensweig (1967)
Negroes	in Surinam	Luyken c.s. (1971)
Chinese	in Australia	Davis and Bollin (1967)
Chinese	in U. S. A.	Huang and Bayless (1968)
Thais	in Thailand	*Nutrition Reviews* (1969)
Jews	in Israel	Gilat c.s. (1970)
Arabs	in Israel	Gilat c.s. (1971)
Cypriots	in England	McMichael c.s. (1966)
Eskimoes	in Greenland	Gudmand and Höyer c.s. (1969 *a*)
Eskimoes	in Copenhagen	Gudmand and Höyer c.s. (1969 *b*)

TABLE 2

Disorders with secundary lactase deficiency

Primary Disease	References
Celiac disease	Plotkin and Isselbacher (1964)
—	Weser and Sleisenger (1965)
Intestinal infections	*Nutrition Reviews* (1967)
Cystic fibrosis	Cozetto (1963)
Post-Gastrectomy	Condon c.s. (1969)
Kwashiorkor	Bowie c.s. (1965)
—	Cook and Lee (1966)
—	Dean (1952)
After Measles	Carpentier (1970)
Tropical sprue	Sheehy and Anderson (1965)
Viral hepatitis	*Nutrition Reviews* (1967)
Intestinal resection	Weyers c.s. (1962)
	Richards (1969)

This discrepancy may be explained by the fact that absolute absence of lactase activity is seldom present and lactose will be tolerated better when this substance is incorporated in the diet. So a reasonable amount of milk, when given in several shares during the day, will be tolerated by almost everybody. Severe symptoms of lactase deficiency and of an absolute absence of lactase activity is described in patients during Kwashiorkor, Celiac disease, severe intestinal infections, extensive intestinal resection (dumping syndrome), following Measles and so on (see table 2).

Treatment of these patients with lactase treated milk (CLAYTON, 1966) was not expected to be a practical approach for large scale use (ROSENSWEIG, 1969). Nevertheless it was our opinion that it would be worthwhile to investigate the technical possibilities of manufacturing lactase-treated milkproducts. We succeeded in developing a procedure by which over 99 p. 100 of the lactose is enzymatically hydrolyzed into glucose and galactose. The progress of the lactose conversion is analyzed by a gaschromatographic procedure.

In the following we will pay attention to the different aspects of the underlaying research.

THE LACTASE PREPARATION

In nature, lactose-splitting enzymes are found in the emulsions of some Rosaceae (almond, peach, apricote and apple trees), the hips of wild roses and the seeds of soybeans, alfalfa and coffee. They are also present in special types of *Asparagillus, Escherichia, Saccharomyces, Neurospora* and many other micro-organisms. Among the animals they are found in snails, the crops of normal chickens, and in the intestine of men, dogs, calves, sheep, pigs, rats, rabbits, bulls, boars and goats (WALLENFELS and MALHOTRA, 1961 ; POMERANZ, 1964), but not in the intestine of seals, sea-lions or walruses (SUNSHINE and KRETCHNER, 1964 ; KERRY and MESSER, 1968). Milk does not contain this enzyme (JENNES and PATTON, 1959).

For technical production this enzyme is isolated from adapted selected strains of *Saccharomyces torulopsis, Saccharomyces fragilis, Saccharomyces lactis, E. coli, Asparagillus niger* and so on.

The lactase preparation should have the following qualifications :

a) high activity, otherwise too much of the enzyme will be needed and too much foreign material must be added to the milk ;

b) it must be active at normal milk pH, otherwise acid and alkaline substances should be added to the milk and protein structure may be damaged ;

c) it should have a very low bacterial count, otherwise the milk will be spoiled before the desired degree of conversion of the lactose will be obtained ;

d) it should contain neither biological toxins nor other toxic substances ;

e) it should contain no lipase in order to prevent fat hydrolysis ;

f) it should contain no protease, otherwise an undesirable change in protein structure may occur ;

g) it should possess no zymase activity, otherwise, especially the glucose formed from the lactose, is fermented ;

h) during processing the milk should not undergo undesirable changes like deterioration of flavor and taste ;

i) an important economic point is that the price should be reasonable.

For our production we use the lactase Maxilact, produced by the Royal Netherlands Fermentation Industries Ltd. This enzyme, which is produced from a special type of *Saccharomyces lactis*, has a pH optimum at 6.8-7.0. It is inactivated at 40°C and has an optimum activity at 35°C. The activity is about 40,000 ONPG units per gram. The enzyme activity is enhanced by potassium and ammonium ions and diminished by sodium.

Heavy metals like copper destroy the enzyme activity.

PRETREATMENT OF THE MILK

The whole or skimmed milk to be treated, should be fresh and of a high bacteriological standard. In milks with a medium quality, lactase activity proved to be inhibited. Moreover during the incubation the risk of further spoiling of this milk is too high.

In order to prevent spoiling the milk during incubation very strict bacteriological conditions should be maintained before and during incubation. Raw milks contain a lactase-inhibitor which is inactivated by pasteurizing the milk beforehand (Van Dam c.s., 1950 ; Wendorff c.s., 1970). From a paper by Potter and Webb (1951), can be learned that at a fixed lactase/lactose ratio the enzymatic activity is at a maximum at a lactose concentration of about 5 p. 100. Wendorff c.s. also found a lower lactose conversion in concentrated skimmed milk.

In experiments with reconstituted skimmed milkpowder at 10, 30 and 45 p. 100 TS, we found at a fixed lactase/lactose ratio, no significant difference in the lactose conversion rate. At higher total solids, however, more oligosaccharides were formed.

INCUBATION TEMPERATURE AND TIME

The optimum temperature of the process depends on the type of enzyme used. In general Yeast lactase has an optimum for enzyme activity at 35-45°C depending on incubation-time (Pomeranz, 1964), whereas fungal lactase from *A. niger* has an optimum at 50-55°C (Lactase LP from Wallenstein Corp. and Lactase AN from Lakeside Lb.). Our lactase obtained from the Royal Dutch Fermentation Industries has its optimum at about 35°C.

Incubation-time depends on the amount, the type and the activity of the enzyme used and on the degree of conversion wanted. These figures should be tested beforehand by laboratory tests on milk and cannot be calculated from the activity of the enzyme as given by the supplier, nor by activity measurements on pure lactose nor on a synthetic substrate.

MEASUREMENT OF LACTASE ACTIVITY AND LACTOSE CONVERSION

Lactase activity is commonly expressed in ONPG units. This unit is related to the amount of *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, a synthetic substrate which hydrolyzes into galactose and *o*-nitrophenol, the latter substance can be measured easily. The activity found with this synthetic substrate does not correlate well with the amount of enzyme, which is needed in practice, since the activity of the enzyme depends on the substrate and is influenced by activators and inhibitors which are present in the milk. So we prefer measuring the lactose hydrolysis in the milk itself.

Lactose hydrolysis may be followed in different ways. We compared :

1° a titrimetric method with chloramine T ;

2° an enzymatic procedure for glucose (with glucose oxydase, peroxydase and O.-dianisidine in a *Tris*- buffer) ;

3° an other enzymatic procedure for the galactose liberated (with galactose-dehydrogenase and NAD^+) ;

4° a gaschromatographic method where the carbohydrates are converted beforehand into their trimethylsilylethers. These ethers are injected into a gaschromatograph, separated on a SE 30 column and measured by a flame ionization detector.

The details of the latter method will be given in a following chapter.

The results of this comparison are given in table 3.

In our opinion reliable results, in analyzing lactose conversion, can only be obtained by the gaschromatographic method.

TABLE 3

Lactose conversion measured by different analytical procedures

Time (h)	Chloramine T (%)	Glucose-oxydase (%)	Galacto-dehydrogenase (%)	Gaschromato-graphy (%)
1	15	15	13	13
2	24	23	20	22
4	37	39	32	40
7	51	57	48	60
24	79	90	79	91
31	83	98	84	95
48	89	94	90	98

FURTHER TREATMENT OF THE FERMENTED MILK

When the desired degree of conversion is reached, the milk is pasteurized, preconcentrated and spray-dried.

Both glucose and galactose are chemically more reactive than lactose. Conse-

quently this fermented milk shows a considerable amount of Maillard-reaction, as a consequence of the heat treatment during sterilizing. Colour, flavour and taste also deteriorate considerably during storage in a liquid form. In respect to these aspects only the (spray) dried product is acceptable. This product can be dissolved and used in the same way as normal milk powders, only its taste is somewhat sweeter than that of the untreated milk.

Our product is gaspacked in 1 pound tins and sold under the name Lactalac V and Lactalac M; whole — and respectively skimmed lactase — treated milk powder. Up to now this fermented milk was accepted very well both in lactase deficient infants and in adults with a dumping syndrome and in other cases of chronic diarrhoea.

GASCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS DURING LACTASE TREATMENT OF THE MILK

In this method 2ml of the milk are dried at a reduced temperature, for instance in a laboratory vacuum drier or by an azeotropic destillation with benzene. Benefit of the latter method is that at the same time the fat is removed from the sample. The carbohydrates are converted to their trimethylsilylethers by a modification of SWEELEY's method (1963) as shown in figure 1. The residue after drying the milk sample is suspended in 5 ml of dry dimethylsulfoxide and heated in a boiling water bath. Half a ml of this suspension is mixed with 1 ml of dry pyridine and 0.4 ml of hexamethyldisilazane and 0.2 ml trimethylchlorosilane (obtainable from PIERCE) are added.

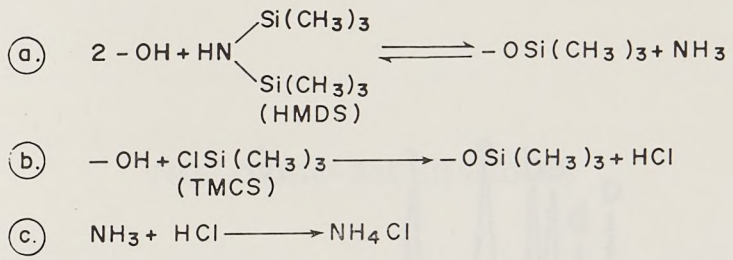


FIG. 1. — *Trimethyl silylating according to* SWEELY (1963)

The mixture is shaken vigorously for about 30 seconds, centrifuged in order to precipitate undissolved minerals, proteins and so on. From the supernatant 1-2 microliters are injected on the column of a Varian 2100 gaschromatograph, provided with a Flame ionization detector. The column (glass) has a length of about 1.8 m, internal diameter 3 mm and is filled with 3 p. 100 SE 30 on Varaport 30. Temperature 170°C, after 15 minutes temperature is increased up to 250°C (10°C per min), carrier gas nitrogen (20 ml per min). The output of the detector is fed to a Varian electronic integrator (type 480) and logarithmically registrated on a Varian recorder (Model 20).

Under these circumstances lactose gives two peaks (α and β) just like glucose

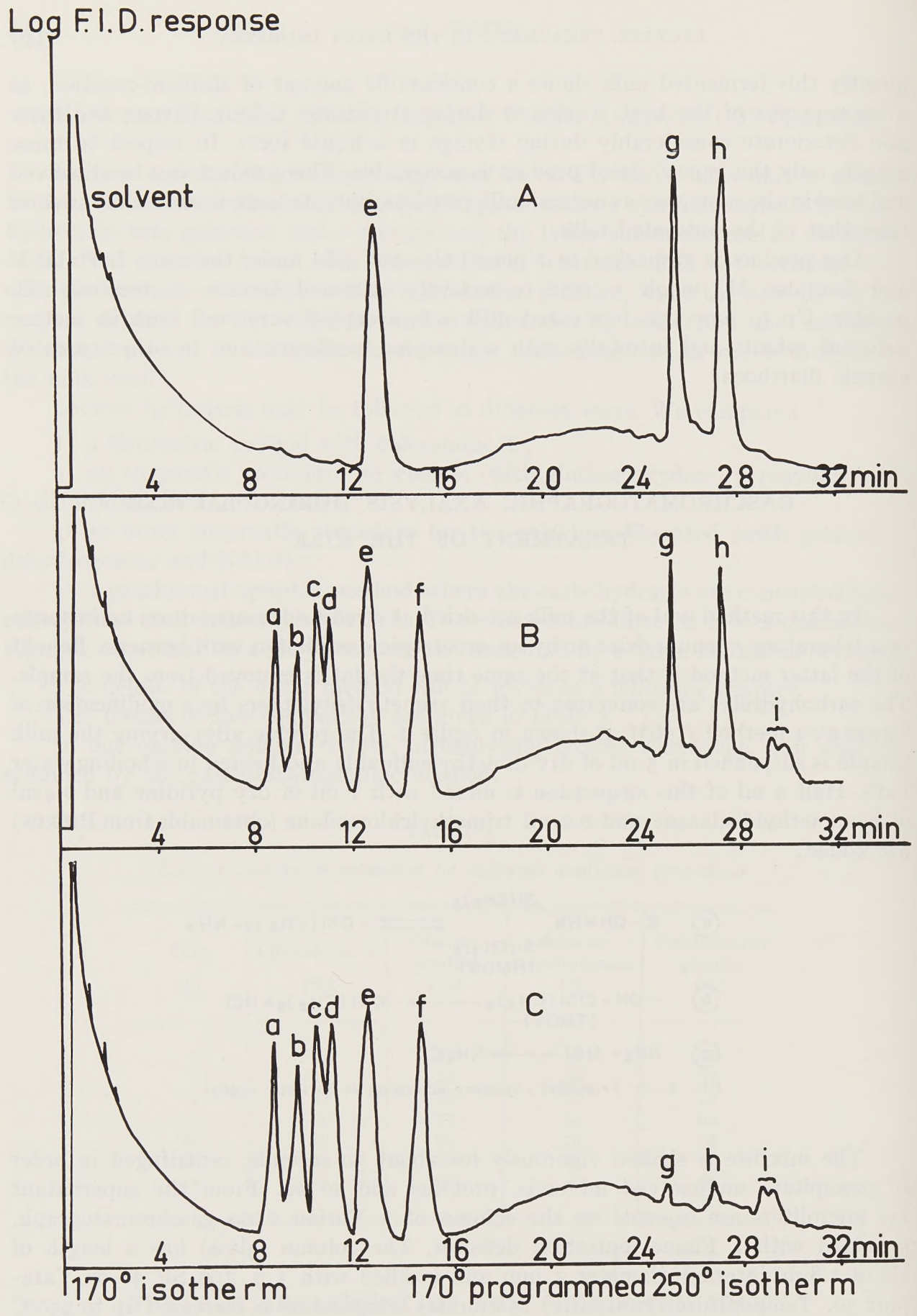


FIG. 2. — *Results of the gaschromatographic analysis during lactase treatment of the milk*

A : before incubation
B : after 7 hours incubation
C : after 40 hours incubation

Signification of letters : a = γ-galactose ; b = α-galactose ; c = α-glucose ; d = β-galactose ; e = mannitol (internal standard) ; f = β-glucose ; g = α-lactose ; h = β-lactose- ; i = other disaccharides.

whereas 3 peaks were obtained from galactose. See figure 2, mannitol is used as an internal standard.

During the lactase action the lactose peaks are decreasing whereas peaks of monosaccharides arise. Moreover two other peaks appear with a somewhat longer retention time than those from the lactose. These peaks disappear by continuing the incubation (see table 4).

TABLE 4

Carbohydrate analysis during milk incubation

Compound method (h)	Glucose		Galactose		Lactose GLC	Disaccharides GLC	Trisaccharides GLC
	enzymatic (%)	GLC	enzymatic	GLC			
1	0.38	0.30	0.33	0.23	4.37	0.02	0.07
2	0.58	0.53	0.50	0.40	3.91	0.04	0.11
4	0.98	0.98	0.81	0.72	2.98	0.11	0.20
17	1.42	1.44	1.19	1.13	2.00	0.20	0.23
24	2.26	2.23	1.98	1.81	0.46	0.29	0.20
31	2.45	2.35	2.10	1.88	0.25	0.25	0.25
48	2.35	2.45	2.25	2.15	0.11	0.16	0.15

The formation and disappearance of the oligosaccharides can be better observed in a somewhat modified procedure in which a short (50 cm) column is used and the temperature program is increased up to 300°C. Under these circumstances also trisaccharides can be observed, especially when concentrated lactose solutions are incubated.

THE OLIGO-SACCHARIDES

The formation of oligo-saccharides during enzymatic attack of lactose by lactase preparations from various sources was studied by ARONSON, BALLIO, PAZUR, ROBERTS and WALLENFELS c.s. The lactase should be considered as a galactosyl transferring enzyme. The reactions involved are outlined in figure 3. When the acceptor is water, the lactose is hydrolyzed and glucose and galactose are the reaction products. When the acceptor is glucose, 6-O-β-D-galactopyranosyl-D-glucose (*allo*-lactose), 3-O-β-D-galactopyranosyl-D-glucose, or 4-O-β-D-galactopyranosyl-D-glucose (lactose) are formed (reaction *b*).

With galactose as acceptor 6-O-β-D-galactopyranosyl-D-galactose (galactobiose) and other isomers may be formed (reaction *c*).

Trisaccharides are formed when the acceptor is a disaccharide, like lactose, *allo*-lactose or galactobiose. Up to eleven different spots were observed during

paper chromatography of the conversion products of lactose with lactase. These oligosaccharides were observed with enzymes of different sources and both *in vitro* as well as in the ceca of rats after loading with lactose (ROBERTS and MCFARREN, 1953).

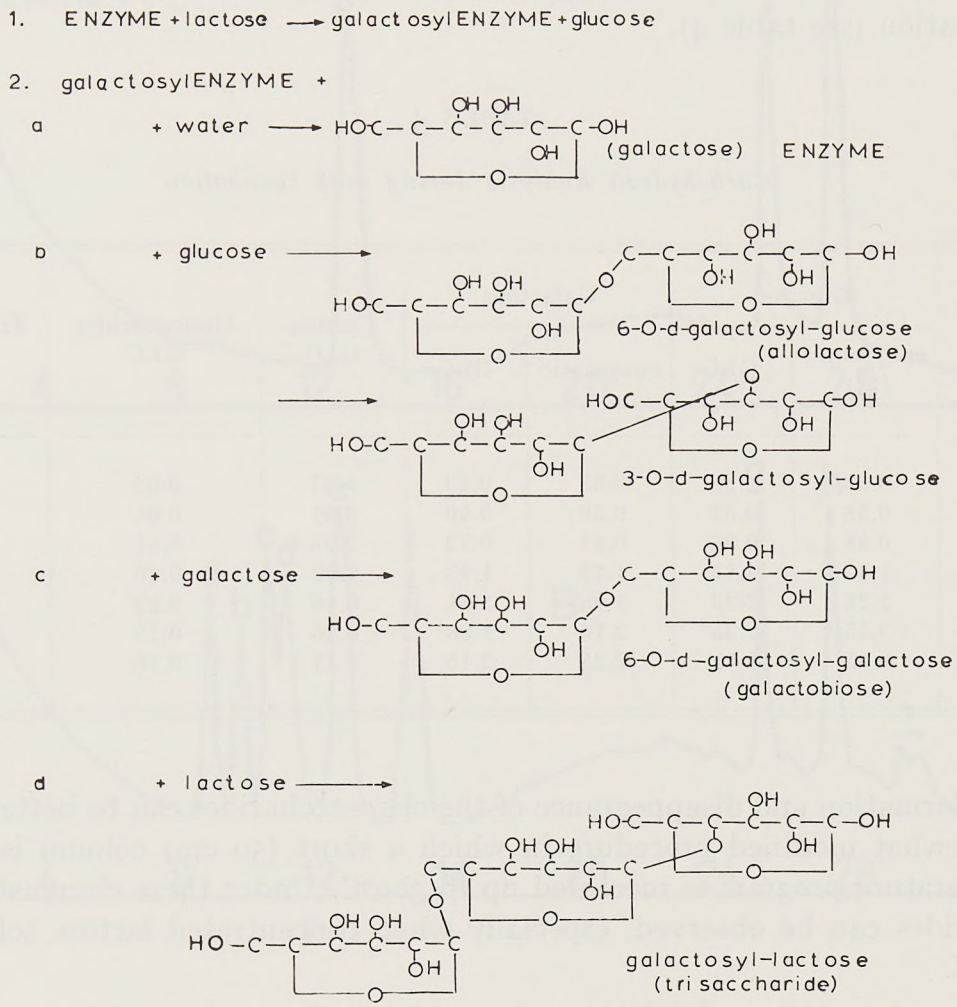


FIG. 3. — *Reactions involved by the galactosyl transferring enzyme*

OTHER APPLICATIONS OF LACTASE TREATMENT

Lactase treatment is also recommended in order to increase the total amount of whey solids which can be tolerated in animal feeds. However, it is our opinion that this treatment, up till now, is too expensive for this application. The same will hold for the lactase treatment of milk or whey to be used in the bakery industry (POMERANZ, 1964).

Lactose crystallization during storage of sweetened condensed milk, frozen ice cream and so on, can be prevented by a treatment of the milk with lactase (STIMPSON, 1954; POTTER c.s., 1951 ALBRECHT c.s., 1956; WENDORF c.s., 1970). The; formation of highly reactive monoses, however, will injure the quality of the sweetened condensed milk (non-enzymatic browning) ; moreover the sandyness due

to the lactose crystallization can be prevented by seeding this product with small lactose crystals.

Crystal formation in ice cream can be retarded by addition of thickening agents.

Our conclusion is, that up till now lactase treatment of milk is only important for the preparation of milk products for a restricted amount of patients with a severe lactase deficiency, either inborn or obtained later on. For these patients a high conversion of the lactose will be necessary.

RÉSUMÉ

LA LACTASE — SON EMPLOI DANS L'INDUSTRIE LAITIÈRE

Dans les publications médicales récentes, il a souvent été question de l'intolérance au lactose. Dans la plupart des expériences relatées, le lactose était administré en quantités très importantes et non-physiologiques. Cette intolérance au lactose est causée par l'impossibilité pour l'intestin de se sécréter suffisamment d'enzyme lactase. En effet, aucun effet nocif n'a été constaté après l'ingestion d'une dose équivalente de glucose + galactose.

Bien que la déficience en lactase soit fréquemment constatée dans les pays en voie de développement, on observe rarement l'absence totale d'activité lactasique. Aussi, l'absorption de lait en quantité raisonnable, répartie en plusieurs fois durant la journée est tolérée par presque tout le monde. C'est seulement dans les rares cas d'absence totale de lactase qu'un traitement du lait avec lactase s'impose (l'absorption par voie buccale d'une préparation lactasée par les patients s'est montrée jusqu'à présent inefficace).

Pour de tels patients, nous avons mis au point un procédé grâce auquel 99 p. 100 du lactose est hydrolysé en glucose + galactose. On suit la progression de la transformation au moyen d'une chromatographie en phase gazeuse.

Étant donné que l'activité de la lactase est à son optimum à 37°C, il faut accorder une attention toute particulière à l'hygiène et à la qualité tant du lait que de l'enzyme, ainsi qu'au matériel et à la manipulation durant l'incubation. Ceci afin d'éviter toute contamination microbienne. Ce procédé est le résultat d'un compromis entre la rapidité de la digestion, la proportion d'enzyme, le risque d'infection, le temps d'incubation, etc.

Le glucose et le galactose réagissent plus intensément que le lactose, de sorte que le lait ainsi traité est plus sensible au traitement par la chaleur. Pour cette raison, la couleur, la saveur et le goût se détériorent davantage durant la stérilisation. Le produit en poudre obtenu est, toutefois, tout à fait semblable aux laits en poudre ordinaires, avec seulement un goût un peu plus sucré. Après dilution, ce lait traité peut être utilisé tout comme un lait ordinaire.

Jusqu'à présent, ce lait ainsi fermenté a été parfaitement toléré tant par les enfants ayant une déficience en lactase que par les adultes présentant un syndrome de « dumping » ainsi que dans d'autres cas de diarrhée chronique.

Le traitement par lactase est également recommandé pour augmenter la quantité totale d'éléments solides du petit lait pouvant être tolérés dans la nourriture des animaux. Toutefois, j'estime qu'une telle application de la méthode est trop coûteuse et il en est de même pour le traitement des poudres de lait ou de petit lait employées dans l'industrie boulangère.

On peut éviter la cristallisation du lactose pendant la conservation du lait condensé sucré, de la crème glacée et d'autres denrées analogues, par un traitement du lait avec lactase. Toutefois, la formation de monoses intensément réactifs altérera la qualité du lait condensé sucré (brunissement non-enzymatique) ; de plus, la consistance sableuse due à la cristallisation du lactose peut être évitée par l'addition au produit de petits cristaux de lactose. La formation de cristaux dans les crèmes glacées peut être retardée par l'incorporation d'agents épaississants.

Notre conclusion est que le traitement avec lactase présente des avantages uniquement pour la préparation de produits lactasés destinés à un nombre limité de patients c'est-à-dire ceux qui souffrent de déficiences graves en lactase, déficiences soit congénitales soit acquises. Pour de tels patients une transformation poussée du lactose sera nécessaire.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE LAKTASEBEHANDLUNG IN DER MILCHINDUSTRIE

Neuzeitige medizinische Veröffentlichungen berichten von Intoleranzerscheinungen gegenüber Laktose. Es handelt sich dabei aber meistens um sehr grosse nicht physiologische Dosierungen. Laktoseintoleranz beruht auf der Unmöglichkeit des Darmes, genügend Laktase zu bilden.

Eine totale Laktaseabwesenheit ist nur selten beobachtet worden. Eine Laktasebehandlung der Milch ist dann notwendig. (Einnahme per oral eines Laktasepräparates durch Patienten erwies sich bisher als erfolglos.)

Wir haben ein Verfahren ausgearbeitet, bei welchem 99 Prozent der Laktose in Glukose und Galaktose hydrolysiert wird. Die Transformation wird mit Hilfe der Gaschromatographie kontrolliert.

Da das Aktivitäts-Optimum der Laktase bei 37°C liegt, wird die Milch bei dieser Temperatur inkubiert, wobei streng hygienisch vorgegangen werden muss, um mikrobielle Infektionen zu vermeiden.

Glukose und Galaktose reagieren intensiver als Laktose, sodass eine derart behandelte Milch gegen eine Hitzebehandlung empfindlicher ist. Das Pulverprodukt ist dagegen normalen Milchpulvern sehr ähnlich, nur hat es einen stärkeren Zuckergeschmack. Bisher wurde eine solche Milch von Kindern und Erwachsenen gut vertragen.

Eine Laktasebehandlung kann ebenfalls dazu benützt werden, um den totalen Gehalt an Molkentrockensubstanz in der Tiernahrung zu erhöhen. Allerdings ist dieses Verfahren zu kostspielig für eine solche Behandlung. Das gleiche ist der Fall für die Behandlung von Milch- und Molkenpulvern bestimmt für die Bäckerei.

Eine Laktasebehandlung der Milch erlaubt es ebenfalls, die Kristallisation der Laktose in gezuckerter Kondensmilch, Speiseeis und ähnlichen Erzeugnissen zu vermeiden. Die Bildung sehr reaktiver Monosen schädigt aber dabei die Qualität (nicht-enzymatische Bräunung).

Zusammenfassend möchten wir sagen, dass die Laktasebehandlung nur für die Herstellung von Diätmilchprodukten für eine geringe Anzahl von Patienten vorteilhaft ist, nämlich diejenige mit schwerer Laktase-Defizienz.

REFERENCES

Albrecht T. W., Gracy J.-P., 1956. Enzymatic hydrolysis of lactose to control the sandyness defect in ice cream. *Ice Cream Rev.*, **40**, 22.

Alzate H., Gonzalez H., Guzman J., 1969. Lactose intolerance in South American Indians. *Am. J. Clin. Nutr.*, **22**, 122.

Aronson M., 1952. Transglucosidation during lactose hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 370.

Ballio A., Russi S., 1960. Chromatographic fractionation of some oligo-saccharides synthesized from lactose by *Penicilliuum chrysogenum*. *J. Chrom.*, **4**, 117.

Bayless T. M., Rosensweig N. S., 1967. Incidence and implication of lactase deficiency and milk intolerance in White and Negro populations. *Johns Hopkins Med. J.*, **121**, 54-64.

Bayless T. M., Rosensweig N. S., 1966. A racial difference in incidence of lactase deficiency. *J. Am. Med. Assoc.*, **197**, 968.

Bowie M. D., Brinkman G. L., Hansen J. D. L., 1965. Acquired disaccharide intolerance in malnutrition. *J. Pediat.*, **66**, 1083.

Carpentier G., Hondt F. D., Molla A. M., Eggermont E., 1970. Lactose intolerance following measles. *Lancet*, II, 725.

Clayton B. E., Arthur A. B., Francis D. E., 1966. Early dietary management of sugar intolerance in infancy. *Brit. Med. J.*, **5515**, 679.

Condon J. R., Westerholm P., Tanner N. C., 1969. Lactose malabsorption and postgastrectomy milk intolerance, dumping and diarrhoea. *Gut*, **10**, 311.

Cook C. G., Lee F. D., 1966. The jejunum after kwashiorkor. *Lancet*, **11**, 1263.

Cozetto F. J., 1963. Intestinal lactase deficiency in a patient with cystic fibrosis. Report of a case with enzyme assay. *Pediatrics*, **32**, 228.

Dam B. Van, Revallier-Warfemins J. G., Van Dam-Schermerhorn L. L., 1950. Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis*. *Neth. Milk and Dairy J.*, **4**, 96.

Davis A. E., Bolin T., 1967. Lactose intolerance in Asians. *Nature*, **216**, 1244.

Dean R. F. A., 1952. Observations on African children. *East African Med. J.*, **29**, 1.

Gilat T., Kuhn R., Gelman E., Mizrahy O., 1970. Lactose deficiency in Jewish Communities in Israel. *Am. J. Dig. Dis.*, **15**, 895.

Gilat T., Malachi E. G., Sochet S. B., 1971. Lactose intolerance in an Arab population. *Am. J. Dig. Dis.*, **16**, 203.

Gudmand-Höyer E., Jarnum S., 1969. Lactose malabsorption in Greenland Eskimoes. *Acta Medica Scand.*, **186**, 235.

Gudmand-Höyer E., Jarnum S., 1969. Lactose malabsorption has grönloendere. *Ugeskr. Laeger*, **131**, 917.

Haemmerli U. P., Kistler H., Ammann R., Marthaler T., Semenza G., Auricchio S., Prader A., 1965. Acquired milk intolerance in the adult caused by lactose malabsorption due to a selective deficiency of intestinal lactase activity. *Amer. J. Med.*, **38**, 7.

Huang S. S., Bayless T. M., 1968. Milk and lactose intolerance in healthy Orientals. *Science*, **160**, 83.

Jennes R., Patton S., 1959. *Principles of dairy chemistry*. John Wiley and Son N. Y., p. 80.

Kerry K. R., Messer M., 1968. Intestinal glycosidases of three species of seals. *Compt. Bioch. Physiol.*, **25**, 437.

Kretchner N., Ronsome-Kuti O., Hurwitz R., Dungi C., Alakija W., 1971. Intestinal absorption of lactose in Nigerian ethnic groups. *Lancet*, II, 392.

Luyken R., Luyken-Koning F. W. M., Immikhuizen M. J. T., 1971. Lactose intolerance in Surinam. *Trop. Geogr. Med.*, **23**, 54.

Luyken R. Private communication.

Luyken R., Luyken-Koning F. W. M., 1972. Lactose intolerance in Kenia. *Proc. Nutr. Soc.*, in preparation.

McGillivray W. A., 1968. Lactose intolerance. *Nature*, **219**, 615.

McMichael H. B., Webb J., Dawson A. M., 1966. Jejunal disaccharides and some observations on the cause of lactase deficiency. *Brit. Med. J.*, II, 1037.
Nutrition Reviews, **25**, 265, 1967, Primary Lactase Deficiency.
Nutrition Reviews, **27**, 278, 1969, Lactase Deficiency in Thailand.
Nutrition Reviews, **28**, 138, 1970, Intestinal Lactase, an inducible enzyme?

Pazur J. H., 1953. Enzymatic conversion of lactose in galactosyl oligo-saccharides. *Science*, **117**, 355.

Pazur J. H., 1954. The mechanism of enzymatic synthesis of galactosyl oligo saccharides. *J. Biol. Chem.*, **208**, 439.

Pazur J. H., Tipton C. L., Budovick T., Marsh J. M., 1958. Structural characterization of products of enzymatic disproportionation of lactose. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 119.

Pazur J. H., Marsh J. M., Tipton C. L., 1958. Reversible transgalactosylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1433.

Plotkin G. R., Isselbacher K. J., 1964. Secondary disaccharidase deficiency in adult celiac disease (non tropical sprue) and other malabsorption states. *New Engl. J. Med.*, **271**, 1033.

Pomeranz Y., 1964. Lactase (beta-*d*-galactosidase). I. Occurrence and properties. *Food Technology*, p. 88.

Pomeranz Y., 1964. Lactase (beta-*d*-galactosidase). II. Possibilities in the food industries. *Food Technology*, p. 96.

Potter F. E., Webb B. H., 1951. The enzymatic hydrolysis of lactose in skimmilk and whey. *The Butter, Cheese and Milk products J.*, p. 24.

Richards A. J., Condon J. R., Mallinson C. N., 1969. Lactose intolerance following extensive small intestinal resection. *Brit. J. Surgery*, **58**, 493.

Roberts H. R., McFarren E. F., 1953. The chromatographic observation of oligo-saccharides formed during the lactase hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.*, **36**, 620.

Rosensweig, N. S., 1969. Adult human milk intolerance and intestinal lactase deficiency. *J. Dairy Science* **52**, 585.

Sheehy T. W., Anderson P. R., 1965. Disaccharidase activity in normal and diseased small bowel. *Lancet*, II, 1.

Skála J., Lamačová V., 1971. Diets in lactose intolerance. *Nutrition and Metabolism*, **13**, 200.

Stimpson E. G., 1954. Frozen concentrated milk products. U. S. patent 2.668.765. Febr, 9.

Stimpson E. G., 1954. Conversion of lactose to glucose and galactose. U. S. patent 2.681.858. June, 2.

Sunshine P., Kretchner N., 1964. Intestinal disaccharidases : Absence in two species of sea lions. *Science*, **144**, 850.

Sutedjo, 1971. Cow's milk intolerance among Indonesian doctors. *Paediatrica Indonesia*, **11**, 43.

Sweeney C. C., Bentley R., Makita M., Wels W. W., 1963. Gasliquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497.

Townley R. R. M., 1966. Disaccharidase deficiency in infancy and childhood. *Pediatrics*, **38**, 27.

Wallenfels K., 1951. Enzymatische Synthese von Oligosacchariden, aus Disacchariden. *Natur-Wiss.*, **33**, 306.

Wallenfels K., Brent E., Limberg G., 1953. Über den Verlauf der enzymatischen Spaltung von Lactose mit β-galactosidase von Schimmelpilzen, *Helix pomata*, *Escherichia Coli* und Kälberdarm. *Lie big's Ann. der Chemie*, **584**, 63.

Wallenfels K., Fischer J., 1960. Untersuchungen über Milchzuckerspaltende Enzyme. Die Lactase des Kälberdarms. *Hoppe Seiler's Z. der Physiol. Chemie*, **321**, 223.

Wallenfels K., Malhotra O. P., 1961. Galactosidases in. : *Advances of carbohydrate Chemistry*, **16**, 239.

Welsh J. D., Rohrer V., Knudsen K. B., Panstian F. F., 1967. Isolated lactose deficiency. Correlation of laboratory studies and clinical data. *Arch. Intern. Med.*, **120**, 261.

Wendorff W. L., Amundson C. H., Olson N. F., 1970. The effect of heat treatment of milk upon the hydrolysability of lactose by the enzyme lactase. *Journal of Milk and Food Techn.*, **33**, 377.

Weser E., Sleisenger M. H., 1965. Lactosuria and lactase deficiency in adult coeliac disease. *Gastro-enterology*, **48**, 571.

Weyers H. A., Kamer H. J., v. d. 1962. Diarrhoea caused by deficiency of sugar splitting enzymes II. *Acta Paediat.* (Scand.), **51**, 371.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 357-366.

THE REPLACEMENT OF CALF RENNET BY MICROBIAL AND OTHER PROTEOLYTIC ENZYMES DURING THE CLOTTING OF MILK

P. J. de KONING

Netherlands Institute for Dairy Research (NIZO), Ede (the Netherlands)

SUMMARY

The clotting of milk in the manufacture of cheese is caused by a proteolytic enzyme called rennet. The original source of this enzyme is the calf's stomach. The large increase in cheese consumption in the world and the decrease in the numbers of young calves available for making rennet have led to a world shortage of rennet.

During the last ten years increasing research has been developed in the replacement of calf rennet. For this purpose various proteolytic enzymes are investigated. In principle these type of enzymes can be isolated from various sources such as animal tissue, vegetable fibre and microbial cultures. At the moment the most important replacers for calf rennet are : the rennet/pepsin mixture 50 : 50, and the microbial rennet preparations isolated from *Mucor pusillus* LINDT, *Mucor miehei* and *Endothia parasitica*.

For the development of enzyme preparations which can replace calf rennet it is important to have an insight in the fundamental aspects of the clotting process. When rennet is added to milk, the casein, which can be considered as the main protein component, is coagulated. During the destabilization of the casein complex under the influence of rennet two phases can be distinguished :

1. The enzymatic primary phase, in which the protective colloid of the casein micelle is destroyed ;
2. The second phase, in which the coagulum is formed under the influence of calcium ions.

A short treatment of the theoretical aspects of these phases will be given. For the application of rennet replacers a number of practical screening tests have been developed which can give an insight in the prospects of the investigated enzyme preparations by use in cheese production. The proteolytic ability of rennet replacers may be characterized by an increase of non-protein nitrogen (NPN) in the coagulated milk. Bitter substances and short consistency may be tested by application of the so called « rapid test ». For drawing a final conclusion the results obtained in cheesemaking by the above mentioned rennet replacers are discussed.

INTRODUCTION

The application of calf rennet as a milk clotting enzyme for the production of cheese has been known for centuries. We do not know, when and how man discovered that cheese could be made from milk. However, there is an ancient legend

which records that cheesemaking was discovered accidently by an Arabian merchant who stored his supply of milk in a pouch made of a sheep's stomach and used it as provisions for a long day's journey through the desert. The heat of the sun, combined with the rennet in the lining, caused the milk to separate into curd and whey. At night he discovered that the whey slaked his thirst and the tasty curd satisfied his hunger.

This story can be considered as a legend!

Nevertheless it is sure that in older times the production of cheese was known with the Greek, the Egyptian and Roman peoples, and as such can be regarded as one of the oldest techniques of preservation. Before the term of the century, cheese was made exclusively on the farm. Four materials are essential for cheesemaking: milk, souring bacteria, salt and rennet.

The enzyme rennet is of special interest in this respect, because it converts the casein of the milk into a gel. After this gel has been cut and the whey has been drained off, the curd blocks are placed in cheese vats and are pressed and brined.

The enzymes of the souring bacteria and the salt are important for the ripening of the cheese during storage.

TABLE I

Milk clotting enzymes

Animal Proteases	Plant Proteases	Microbial Proteases
Calf rennet	Papain	From the fungi
Bovine pepsin	Ficin	*Mucor pusillus*
Pig pepsin	Bromelein	*Mucor miehei*
Rennet/pepsin 50 : 50		*Endothia parasitica*
Trypsin		From the bacteria
Chymotrypsin		*Bacillus subtilis*
Pancreatin		*Bacillus cereus*
		Bacillus polymyxa

PRODUCTION OF CALF RENNET

The milk coagulating enzyme rennet is derived from the abomasum, or fourth stomach of unweaned calves.

After the calf has been slaughtered, its stomach is emptied, inflated and dried in a powerful stream of air at a low temperature. Before being extracted, the dried stomachs are cut into pieces and mixed with wood-wool. The extraction takes place in counterflow circulation with a 10 p. 100 salt solution. After the rennet solution is activated at a low pH, it is passed through a Seitz-filter, in order that good bacteriological quality is obtained. For this purpose a preserving agent is also added. Finally the activity is tested and the rennet solution is standardized at the usual cloting power before being dispatched to the customer.

PROPERTIES OF THE ENZYME RENNIN

The pure and active component of the rennet extract is called rennin, the word rennet is being used to indicate the crude extract of the calves' stomachs.

When rennin is added to milk, the casein, which is present in a concentration of about 2.65 p. 100, is coagulated. From electrophoretic experiments it is known that the casein in milk is mainly composed of α_s-, β- and $\varkappa$-casein. Particularly $\varkappa$-casein plays an important role in the clotting process of milk, because it protects the casein micelle against flocculation by calcium ions. Casein occurs in milk in the shape of more or less spherical particles with diameters up to approximately 300 nm. During the destabilization of the casein complex under the influence of rennin two phases can be distinguished.

1. The enzymatic primary phase, in which the protective colloid of the casein micelle is destroyed ;
2. The second phase, in which the coagulum is formed under the influence of calcium ions.

Of the numerous theories which have been developed to explain the primary phase of rennin action, that of the Danish workers LINDERSTRÖM LANG (1) and HOLTER (2) is still valid. In this theory the assumption is made that the casein micelles present in milk are kept in solution by a protective colloid. It was shown by WAKE (3) that the component called $\varkappa$-casein could be identified with the protective colloid which appeared to be the primary substrate of the enzyme rennin. During the primary action of rennin on casein, the $\varkappa$-casein component is broken down and a glycomacropeptide (NPN) is split off as follows :

$$\varkappa\text{-casein} \xrightarrow{\text{rennin}} \underset{\text{insoluble}}{\textit{para}\text{-}\varkappa\text{-casein}} + \underset{\text{soluble}}{\text{non-protein nitrogen (NPN)}}$$

The nature of the bond between NPN and *para*-$\varkappa$-casein has been the subject of intensive study. Several possibilities have been investigated, such as peptide bonds, ester bonds, phosphoric amide bonds and bonds to guanidine. It was shown by DELFOUR *et al.* (4) that a phenylalanyl-methionyl bond is hydrolyzed during the primary action of rennin on casein. This indicates that the clotting power of rennin is based on the specific proteolytic action on the Phe-Met bond in $\varkappa$-casein. In the second stage of rennin action, the coagulation of the *para*-casein takes place under the influence of calcium ions. This point is easily observable and forms the basis for measurement of the rennet strength of the enzyme. The second stage of rennin action has many interesting aspects, especially in view of the colloid-chemical properties of casein.

MEASUREMENT OF NPN

It was shown by MATTENHEIMER and NITSCHMANN (5) that the measurement of the amount of NPN which is split off during the action of rennin on casein can be used for studying the primary phase of this reaction. If the amount of NPN is

plotted against the time of incubation of rennin with casein, it is observed that a fast splitting reaction takes place for the first 30 minutes of incubation. During this primary phase of the rennin action the NPN is released from the κ-casein. After the first splitting reaction only a very small increase in the amount of NPN can be observed. This indicates that the enzyme rennin contains a high specific splitting power for the peptide bond between *para*-κ-casein and NPN, but only a very small amount of proteolytic activity in the second stage of the renneting process.

These specific characteristics of rennin, namely a high clotting power and a low proteolytic activity, are of great importance for the production and ripening of cheese.

Especially those types of cheese which have long ripening times are susceptible even to limited proteolytic activity of the rennet used.

PRESENT SUPPLY OF CALF RENNET

In the past few years a shortage of calf rennet has been mentioned repeatedly in the literature (6). It is not sure whether or not these reports had a real basis. Nevertheless it is clear that in the near future a shortage of calf rennet may arise from :

a) a change in the production of meat, which has already led to a decrease in the amount of stomachs of unweaned calves available ;
b) an increase in the consumption of cheese all over the world, so that greater quantities of rennet are required.

Though at the moment a shortage of calf rennet is not acute, it may be a good thing to consider the various possibilities of compensating it :

a) instead of stomachs of unweaned calves, older vells could be used as well ;
b) the extraction procedure might be improved ;
c) the amount of rennet used in cheesemaking could be decreased by addition of $CaCl_2$ to the milk ;
d) calf rennet could be replaced by rennets of other origin.

It has been known for a long time that all proteolytic enzymes are capable of clotting milk. A survey of the milk clotting enzymes tested in practice is given in table 1.

As shown in this table, the milk clotting enzymes can be isolated from various sources, such as animal tissue, plant fibres and microbial cultures.

Apart from calf rennet, pig pepsin has been used for cheesemaking, mostly in experiments. Also, trials have been made with trypsin and with the plant enzymes papain, ficin and bromelein.

Generally all these enzymes tend to produce bitter flavour defects in the cheese.

Recently an interesting observation was made by Fox (7), who found that calf rennet and bovine pepsin were approximately equal in proteolytic activity, and that this activity was much lower than that of pig pepsin. This is important because at the moment an increasing amount of bovine pepsin is present in commercial rennet as a

result of the growing number of stomachs of older calves used for the manufacture of rennet. A more successful application of pepsin is obtained by mixing it in a 50 : 50 proportion with calf rennet. In 1960 MARSCHALL in the United States started with this preparation and in 1964 Chr. Hansen's Laboratory Ltd. also put a similar mixture of calf rennet and pepsin on the market. In the U.S.A. and Canada 80 p. 100 and in the United Kingdom 40 p. 100 of the cheese (most of it Cheddar) is made with this preparation.

The most important microbial rennets are isolated from the fungi Mucor *pusillus* LINDT, *Mucor miehei* and *Endothia parasitica*. The rennets isolated from *bacteria* cultures such as *Bacillus subtilis*, *Streptococcus liquifaciens* or *Bacillus cereus* are less valuable, because they all cause bitterness and intensive proteolysis during ripening.

ASSESSMENT OF RENNET SUBSTITUTES

For the application of rennet substitutes a number of practical screening tests have been developed. Two of the most important properties of a good rennet substitute is a high clotting power combined with a low proteolytic activity during the ripening of the cheese.

A. — *NPN-test*

To determine the proteolytic properties of the enzyme preparations the shape of the NPN-curve was studied. The NPN-curves obtained with bovine pepsin, pig pepsin and the rennet pepsin mixture 50 : 50 are almost identical to that obtained with calf rennet.

Although the microbial rennets isolated from *Mucor pusillus* LINDT, *Mucor miehei* and *Endothia parasitica* showed a good clotting power, it was also observed that the amount of NPN after the first splitting reaction increased, particularly in the case of *Endothia parasitica*. This is in good agreement with the results of the experiments carried out to produce various types of cheese, as will be shown later.

Another specific property of one of these microbial rennets is the susceptibility to calcium ions. It was found that the amount of Noury-rennet used could be halved if calcium chloride was added. The conclusion which can be drawn is that, if the amount of NPN remains practically constant after the first initial rise, due to the conversion of $\varkappa$-casein into *para*-$\varkappa$-casein, there is a fair chance that the rennet preparation is suitable for cheesemaking. If, on the other hand, the NPN continues to increase, which is largely the case with such enzymes as papain and trypsin, the rennet preparations concerned must be considered unfit for the manufacture of cheese.

B. — *Rapid test*

Apart from the NPN-test which gives information concerning the proteolytic activity of the enzyme studied, it would be advantageous if a rapid method were available by which new types of rennet could be assessed for their effect on the organoleptic properties of the cheese.

Recently a simple method was developed in our Institute (8), by which we were

able to predict the organoleptic properties of cheeses which had been made with these different types of rennet. The test was carried out in the following manner : 100 ml milk or skim-milk, pasteurized for example at 74°C for 10 seconds, was mixed in a glass beaker with 1 ml of conventional cheese starter and with ten to twenty times the amount of rennet preparation, required for a normal coagulation time, and held at 30°C. After the milk had coagulated, the flavour and consistency of the curd could be determined.

As a result of this test conducted with various types of rennet it was observed that for the indications « flavour » and « consistency » a great similarity existed between the respective scores of the cheese grading and those of the « Rapid Test ».

C. — *Practical experiments*

A critical judgement of the various experiments may be expressed by the English proverb : « The proof of the pudding is in the eating .» This is particularly true of the various types of rennet that are now on the market and of the many types of cheese which are produced. For the practical use of a new type of rennet a number of aspects have to be considered, such as speed of clotting, effect of pH and concentration of calcium ions, firmness of the curd, rate of drainage, rate of ripening and ultimate flavour, body and texture, yield of cheese, and other less obvious aspects such as :

— suitability for the manufacture of different cheese varieties in one factory ;
— suitability for use in programmed cheese processing ;
— suitability for the production of short and long maturing cheese.

Furthermore it is important that the rennet preparations do not contain any living organisms, specific antibiotics or toxic agents.

All the requirements mentioned above must be considered before any of the new rennet types can be accepted. The dairy institutes in many countries of the world have studied the suitability of new rennet types for the manufacture of their national cheeses. A survey of these investigations was given by NAUDTS (9) in 1969. Since then a number of further investigations have been published (10). From this work it may be concluded that of all the various new rennet types only the rennet-pepsin mixture and the fungal rennets are of interest at the moment for use in the practical production of cheese.

THE RENNET-PEPSIN 50 : 50 PREPARATION

As mentioned before, 80 p. 100 of the cheese production in the United States and Canada and 40 p. 100 of that in the United Kingdom is made with this preparation.

In other West-European countries the application of the rennet-pepsin mixture is still in its infancy. In the Netherlands about 2 p. 100 of the cheese production is made with it.

Generally, the use of pepsin rennet involves a slightly prolonged renneting

time and an equal handling time of the curd, so that the total time of production is slightly longer than that required for cheese made with calf rennet.

Losses of fat and curd fines in the whey are higher (0.02 p. 100 fat and 27 mg/kg respectively) than when calf rennet is used. The flavour and taste are not affected and the protein breakdown shows a similar pattern as that in the control cheese prepared with calf rennet. From this it can reasonably be concluded that the rennet-pepsin mixture enables a satisfactory product to be made.

THE FUNGAL RENNETS

A. — *Rennet isolated from* Mucor pusillus LINDT.

The microbial rennet which is isolated (in Japan) from *Mucor pusillus* L. is marketed in Western Europe by the Dutch firm Noury and Van der Lande, Deventer, Holland. In Europe this enzyme preparation is sold under the brand name Noury-rennet. In the United States other names are used, such as Novadel and Emporase.

Practical experiments with this type of rennet have been carried out by almost all Dairy Institutes in Europe. Also at the Netherlands Institute for Dairy Research large scale experiments were conducted with several types of cheese. The result was that a number of cheese factories received permission of the Government to produce cheese with this type of rennet. These experiments started as early as 1967, so that a great deal of practical information has been obtained in the past four years. The results of all these experiments will shortly be published in a final report (11). It is concluded that the composition of Amsterdam, Edam and Gouda cheese, which had been made with the microbial rennet did not differ significant from that of the control cheese for which conventional calf rennet had been used. The appraisal figures awarded to the cheese made with microbial rennet were 0.2 to 0.3 point lower than those awarded to conventional cheese, both for 'smell and taste' and for 'consistency'. Differences between older cheeses were more pronounced than those between young cheeses. The defect 'bitter' occurred more frequently in experimental cheese than in control cheese. Also, the body of the former was somewhat softer and less coherent. Older experimental cheeses had eyes that were slightly too big.

B. — *Rennet isolated from* Mucor miehei

A microbial rennet isolated from the fungus *Mucor miehei* is marketed by the Danish firm Novo under the brand name 'Rennilase'. A similar rennet preparation is produced by the American firm Miles, which uses the fungus *Mucor miehei* NRRL 3420.

A third preparation, isolated from *Mucor miehei* NRRL 3169, is marketed by Baxter Laboratories under the brand-name 'Rapidase'. As these preparations were developed quite recently, only a limited number of experiments have been pub-

lished at this moment. From inside information it is known that experiments are being carried out at the dairy institutes in most West-European countries. It will not be long before the results of these experiments are known.

C. — *Rennet isolated from* Endothia parasitica

The microbial rennet isolated from the fungus *Endothia parasitica* is marketed by Pfizer and Co under the brand names ' Sure Curd ' and ' Suparen '. This preparation was first used in the United States in 1967. Since then favourable results but also criticisms have been reported. The most critical points are the development of the defect ' bitter ' during the ripening period of the cheese, and a high proteolytic activity which affects the consistency of the cheese.

GENERAL REMARKS

If the results obtained with the NPN-test and the Rapid-test are compared with the final conclusions of the experimental cheese production, it is clear that at the moment it is rather difficult to predict the proteolytic activity of the rennet substitutes during the course of a long ripening period. Particularly for the matured cheeses long-term experiments under practice conditions will be required before a new type of rennet can be accepted. In addition, it will be necessary to develop methods by which the quality and reproducibility of the applied enzyme preparations can be controlled. In this respect the proteolytic breakdown of β-casein and of other casein components are important factors in relation to the occurrence of the defect ' bitter '.

More research work will also have to be carried out in order to obtain information concerning such subjects as identification of new rennet types, scientific description of rennet, toxicological properties, cheese ripening, technological improvement, application of new techniques in cheesemaking, etc.

In view of these aspects it is of great value that the International Dairy Federation has established two commissions for the study of fundamental and applied research on these new rennet types.

We hope that these working groups, together with the many specialists in this field, will succeed in finding the best conditions for the application of the various new rennet types that are now on the market and also of those which will possibly be developed in the future.

RÉSUMÉ

REMPLACEMENT DE LA PRÉSURE DE VEAU PAR DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES MICROBIENNES ET AUTRES DURANT LA COAGULATION DU LAIT

La coagulation du lait dans la fabrication de fromage est causée par une enzyme protéolytique qui est appelée la présure. La source de cette enzyme est l'estomac du veau. L'augmentation importante de la consommation de fromage dans le monde et la diminution du nombre

de jeunes veaux nécessaires à la production de la présure ont abouti à une pénurie mondiale de présure.

Durant les dix dernières années les recherches se sont multipliées pour trouver un produit de remplacement de la présure. A cette fin, diverses enzymes protéolytiques ont été examinées. En général, ce type d'enzymes peut être isolé de sources diverses, telles que tissu animal, fibres végétales et cultures microbiennes. Actuellement, les substituts les plus importants de la présure de veau sont : le mélange moitié/moitié de présure et de pepsine, ainsi que les préparations de présure microbienne isolées de *Mucor pusillus* LINDT, *Mucor miehei* et *Endothia parasitica*.

Il est important, pour le développement des préparations d'enzymes destinées à remplacer la présure de veau, d'avoir une connaissance approfondie du principe de la coagulation. Lorsqu'on ajoute de la présure au lait, la caséine, qui peut être considérée comme le principal élément protéinique, est coagulée. Durant la déséquilibration du complexe caséinique sous l'influence de la présure, on peut distinguer deux phases :

1. la phase enzymatique primaire, durant laquelle les colloïdes protecteurs des micelles de la caséine sont détruits ;
2. une phase secondaire, au cours de laquelle le coagulum se forme sous l'influence des ions calcium.

Il sera donné un court développement des aspects théoriques de ces phases.

En ce qui concerne l'application des produits de remplacement de la présure, un bon nombre de tests sélectifs pratiques ont été mis au point, qui peuvent permettre de se faire une idée plus précise des perspectives ouvertes par l'utilisation de ces préparations enzymatiques dans la fabrication de fromage. Le pouvoir protéolytique des substituts de la présure est caractérisé par un accroissement de l'azote non protéique (NPN) dans le lait caillé. Un test rapide est employé pour déceler les substances amères et les défauts de consistance.

En conclusion, les résultats obtenus en fromagerie par les produits de remplacement de la présure précités sont discutés.

ZUSAMMENFASSUNG

ERSATZ VON KÄLBERLAB DURCH MIKROBIELLE UND EIWEISSABBAUENDE ENZYME BEI DER MILCHGERINNUNG

Die Milchgerinnung in der Käseherstellung wird durch ein proteolytisches Enzym, das Lab, hervorgerufen. Der Ursprung dieses Enzyms ist der Kälbermagen. Die erhebliche Erhöhung des Käsekonsums in der Welt und die Verminderung der Zahl der jungen Kälber, nötig für die Erzeugung von Lab, haben zu einem Mangel im Weltmasstab dieses Labs geführt.

Während der letzten zehn Jahre haben sich die Forschungen, um einen Labersatz zu finden, vermehrt. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene proteolytische Enzyme ausprobiert. Im allgemeinen kann diese Enzymgruppe von verschiedenen Quellen, wie Tiergewebe, Pflanzenfasern und mikrobiellen Kulturen gewonnen werden. Die wichtigsten Ersätze des Kälberlabs sind zurzeit : das Gemisch von Lab und Pepsin (in einem Verhältnis von 50 : 50) und die Präparationen mikrobiellen Ursprungs isoliert von *Mucor Pusillus* LINDT, *Mucor Miehei* und *Endothia Parasitica*.

Es ist wichtig dass man für die Entwicklung von Enzympräparaten, bestimmt zum Ersatz des Kälberlabs, eine vertiefte Kenntnis von den Grundsätzen der Milchgerinnung hat. Wenn man Lab zu Milch hinzusetzt, so wird das Kasein, das als der wichtigste Eiweissbestandteil von Milch zu betrachten ist, zum gerinnen gebracht. In diesem Prozess kann man zwei Phasen unterscheiden :

1. Die enzymatische Primärphase, während derer die Schutz-kolloide der Kaseinmicellen zerstört werden ;
2. Eine Nebenphase während derer sich unter dem Einfluss der Calcium ionen die Gallerte bildet.

Eine kurze Darstellung der theoretischen Aspekte dieser Phasen wird gegeben. Was die Anwendung von Labersatz betrifft, sind einige selektive, praktische Teste entwickelt worden, welche eine genauere Idee der möglichen Perspektiven der Anwendung dieser enzymatischen Präparate in der Käseherstellung geben können.

Die proteolytische Wirkung von Labersatzstoffen kann durch eine Erhöhung des Nicht-Protein-Stickstoffs in saurer Milch charakterisiert werden. Ein Schnelltest wird zur Feststellung von bitteren Stoffen und von Konsistenzfehlern benutzt.

Abschliessend werden die Ergebnisse erörtert welche durch die Anwendung von Labersatz in der Käseherstellung erreicht wurden.

REFERENCES

(1) Linderstrøm-Lang K., 1929. *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, **17**, 9.
(2) Holter H., 1932. *Biochem. Z.*, **255**, 160.
(3) Wake R. G., 1957. *A st. J. Sci.*, **20**, 147.
(4) Delfour A., Jollès J., Alais C., Jollès P., 1965. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **19**, 452.
(5) Mattenheimer H., Nitschmann H., 1955. *Helv. Chim. Acta*, **38**, 687.
(6) Fao : 1968. Report of the Fao ad hoc consultation on world shortage of rennet in cheese making. *Meeting Report AN* 1968, 3, Rome, Italy, April 8-11.
(7) Fox P. F., 1969. *J. Dairy Res.*, **36**, 427.
(8) Raadsveld C. W., Klomp H., 1970. *Neth. Milk Dairy J.*, **24**, 133.
(9) Naudts M., 1969. *IDF Annual Bulletin*, VII.
(10) Ritter W., 1970. *Deutsche Molkerei Zeitung*, **48**, 2222.
Pruis J., Nielsen T. K., 1970. *Process Biochemistry*, **34**.
Zwaginga P., Alderlieste P. J., Robbertsen T. *NIZO Rapporten Nr*, **74**, 77.
Berg van de G., Alderlieste P. J., Robbertsen T., Zwaginga P., 1970. *NIZO-Nieuws*, Nr 10.
Emmons D. B., Petrasovits A., Gillan R. H., Bain J. M., 1971. *Food Techn. J.*, **4**, 31.
Thomasow J., 1971. *Milchwissenschaft*, **26** (5), 276.
Ramet J. P., Schlüter A. S., 1970. *Deutsche Molkerei Zeitung*, **40**, 1822.
Thomasow J., Mrowetz G., Schmauke E., 1970. *Milchwissenschaft*, **25** (4), 211.
(11) Alderlieste P. J., 1972. *NIZO-Nieuws*, Nr 2.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 367-383.

RECHERCHES SUR L'ENZYME COAGULANTE DE L'*ENDOTHIA PARASITICA*

O. T. ROTINI et P. SEQUI

Istituto di Chimica Agraria della Università degli Studi di Pisa (Italie)

RÉSUMÉ

Quelques résultats d'une étude sur l'isolement, la purification et les propriétés de l'enzyme coagulant le lait produite par l'*Endothia parasitica*. Cette enzyme présente une stabilité maximum à pH 4,5 et en présence d'ions de calcium.

Un simple procédé de purification de l'enzyme entraîne une brève dialyse, une gel-filtration sur colonnes réunies de Sephadex G 75 et G 200 et chromatographie sur CM-cellulose. Quelques enzymes protéolytiques et protéines inactives sont ainsi séparées de l'activité de l'enzyme coagulant le lait. Ce procédé est très efficace même sur le plan préparatoire.

INTRODUCTION

L'évolution des conditions économiques et zootechniques de notre siècle a déterminé une diminution progressive des disponibilités de présure animale destinée à l'industrie fromagère.

Celle-ci résulte en grande partie de l'obligation d'éviter l'abattage des veaux de lait qui, depuis toujours, ont donné la plus grande quantité de présure industrielle.

D'autre part, l'augmentation progressive des besoins protéiques dans l'alimentation que l'on a constaté au cours des dernières décennies, a déterminé une demande toujours plus importante de produits fromagers.

En conséquence, l'industrie fromagère a subi une crise dans l'approvisionnement de présure traditionnelle ; ceci a donné une nouvelle impulsion aux recherches sur les enzymes coagulantes, d'origine végétale et microbienne.

Ce problème a été abordé par nous-mêmes et ce, à plusieurs reprises, depuis 1930.

Des recherches ont été effectuées sur des enzymes coagulantes d'origine bactérienne (1) ou fongique (2) qui ont permis de brosser un tableau assez clair sur les activités coagulantes de différente nature (3 et 4).

De nouvelles recherches sur les activités coagulantes microbiennes ont été entreprises récemment au Japon, aux U. S. A., en U. R. S. S. ainsi qu'en Italie et en France (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Une enzyme coagulante fongique du *Mucor pusillus* a été extraite, purifiée et cristallisée (12, 13, 14, 15). Le procédé a été breveté par la société japonaise Meito Sangyo (16).

Une deuxième enzyme coagulante a été préparée et purifiée à partir d'*Endothia parasitica* (17,18, 19). Le procédé de préparation a été breveté par la société Pfizer de New York (20).

Les propriétés de toutes ces enzymes, qui sont actuellement les plus répandues et qui ont fait l'objet de très amples recherches, apparaissent en tous points semblables à celles de la présure animale (8, 9, 21).

Ces deux préparations à base d'enzymes, en effet, restent impures : celle de *Mucor pusillus* présente une forte activité amylolytique (24), et celle de *Endothia parasitica* présente un rapport entre activité protéolytique et l'activité coagulante fortement supérieure à celle de la chimase animale (25).

D'autres enzymes susceptibles d'être appliquées dans l'industrie fromagère sont identifiées et préparées à partir de *Bacillus subtilis* (26), *Bacillus cereus* (27), *Bacillus polimyxa* (28), *Streptococcus liquefaciens* (29), *Micrococcus caseolyticus* (10,11), *Aspergillus candidus* (30) et le *Mucor hiemalis* (31).

Arima et coll. (32) donnent la liste de 59 micro-organismes capables de produire des enzymes coagulantes ; toutefois, cette liste apparaît largement incomplète et non limitative.

ÉTUDE D'UNE ENZYME COAGULANTE D'*ENDOTHIA PARASITICA*

Toutes nos recherches ont été dirigées vers la préparation d'une enzyme coagulante à partir de l'*Endothia parasitica* qui, en fait, ne détermine pas les effets négatifs qu'on a eu à déplorer pendant la maturation du fromage.

La purification de l'enzyme a déjà été étudiée par différents auteurs (18,19), qui ont du reste rencontré des difficultés dues certainement à l'instabilité de l'enzyme même lorsque l'on traite avec un pH supérieur à 6 (19) ; étant donné que, à la concentration des ions hydrogènes à laquelle l'enzyme présente son maximum de stabilité (pH 4,5) on n'a pas observé d'absorption par les résines carboxyliques (18) employées dans ce but.

Une première série de nos recherches a été consacrée à la stabilité de l'enzyme à différentes valeurs du pH, et aux différentes températures ainsi qu'à l'influence que les ions Ca^{++} présentent sur la stabilité de l'enzyme même (33). Les résultats des essais de stabilité, en fonction du pH aux différentes températures, sont représentés dans la figure 1. Les essais ont été effectués avec 2,5 mg d'enzyme par ml ; le temps de coagulation de l'essai de contrôle était de 32''. Les essais étaient d'une durée de 24 heures.

Comme il apparaît dans la figure 2 ainsi que dans le tableau 1, l'enzyme présente une forte instabilité, même à la température ambiante lorsque les valeurs de la concentration en ions hydrogènes sont très proches de la neutralité.

Après 24 heures, à une température de 34°C, l'enzyme perd totalement son activité si les valeurs du pH s'élèvent au-dessus de 6 ; alors qu'elle garde une certaine stabilité à pH 4,5.

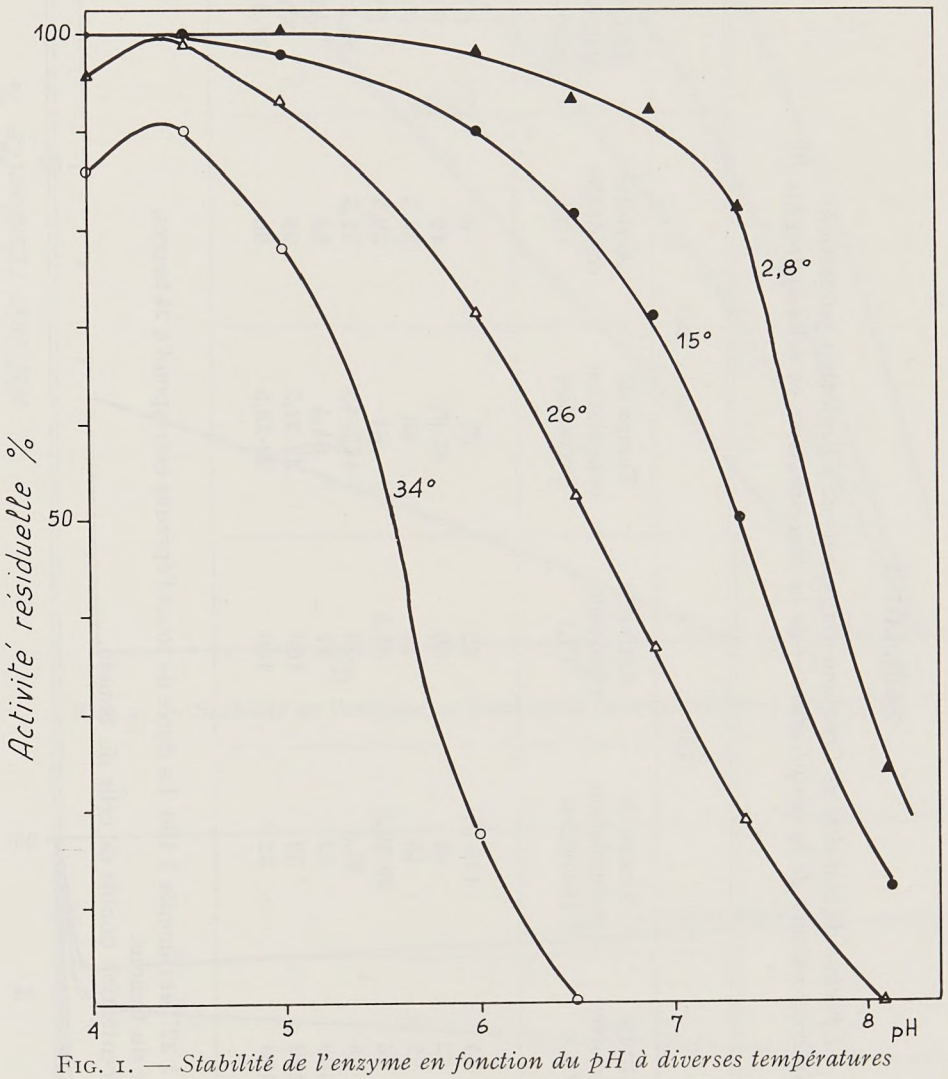


FIG. 1. — *Stabilité de l'enzyme en fonction du pH à diverses températures*

A 26°C, l'enzyme reste stable jusqu'à pH 6 (72 p. 100 de l'activité initiale) ; mais elle perd la plus grande partie de son activité lorsqu'elle est soumise à des valeurs supérieures à 6,5, et elle est complètement inactive à pH 8,15.

A 15°C l'activité de l'enzyme est réduite de moitié à pH 7,3, alors que à 2,8°C l'enzyme conserve entre quatre-vingt et quatre-vingt-dix pour cent de l'activité enregistrée au départ, même si elle est soumise à un pH proche de la neutralité, alors qu'elle est fortement inactive uniquement aux valeurs proches de pH 8.

Des essais parallèles menés afin de déterminer les influences éventuelles du chlorure de sodium sur la stabilité de l'enzyme à pH compris entre 6 et 8, n'ont pas donné de résultats réellement significatifs.

Les données relatives à l'inactivation de l'enzyme en milieu alcalin — pH 8,15

TABLEAU I

*Épreuve de stabilité de l'enzyme coagulante de l'*Endothia parasitica
à diverses valeurs de la température et de la concentration en ions hydrogène (1)

pH	2,8°		15°		26°		34°	
	Temps de coagulation (secondes)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (secondes)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (secondes)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (secondes)	Activité résiduelle (%)
8,15	134	24	134 (2)	12	(3)	0	(3)	0
7,30	39	82	64	50	84 (2)	19	(3)	0
6,85	35	92	45	71	88	36,5	(3)	0
6,5	34,5	93	39-39,5	81,5	61	52,5	(3)	0
6,0	33,5	96	35,5	90	44,5-45	71,5	91,5 (2)	17,5
5,0	32	100	33	97	34,5	93	41	78
4,5	32	100	32	100	32-32,5	99	35,5	90
4,0	32	100	32	100	33-33,5	96	37-37,5	86

(1) Activité de l'enzyme, correspondant à 32″ et ramenée à 100. La durée de toute l'épreuve correspond à 24 heures.
(2) A une concentration double de celle du témoin.
(3) Pas de coagulation même à une concentration double de celle du témoin.

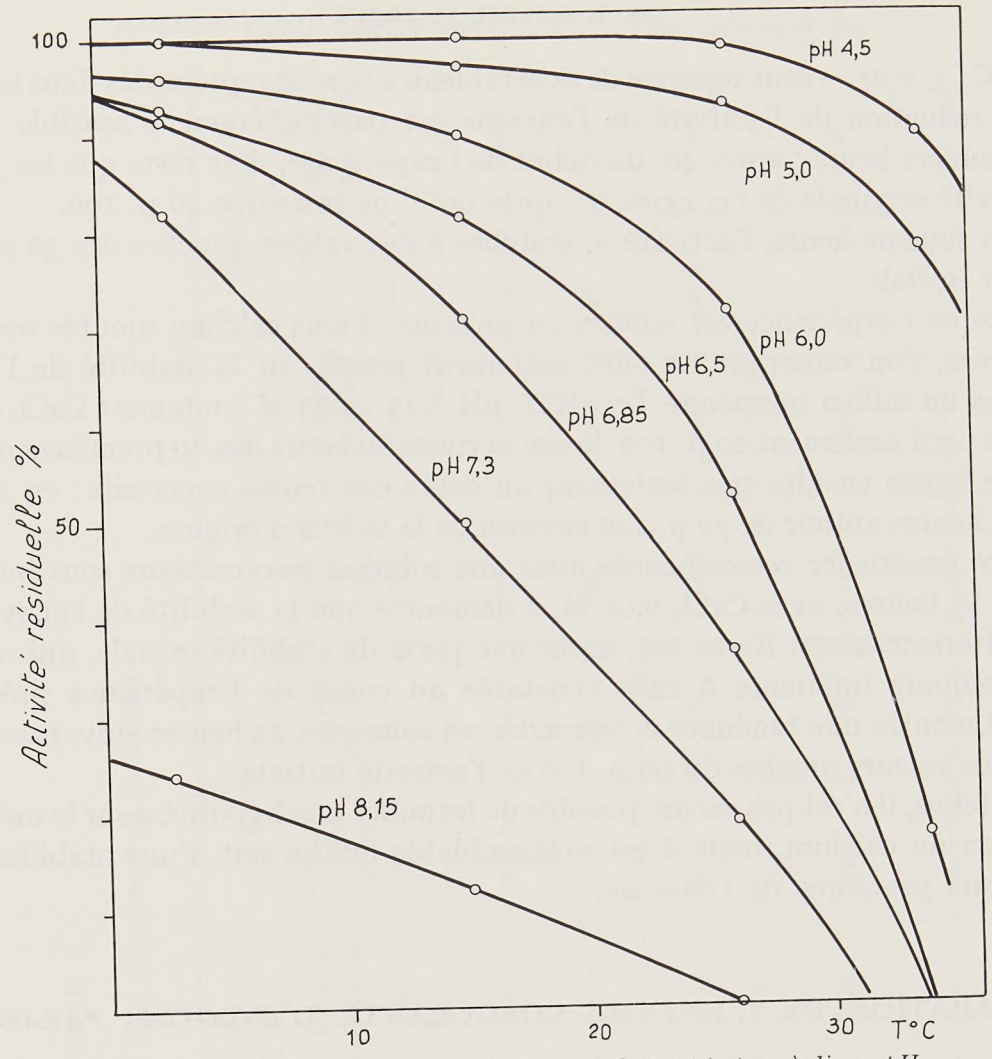


FIG. 2. — *Stabilité de l'enzyme en fonction de la température à divers pH*

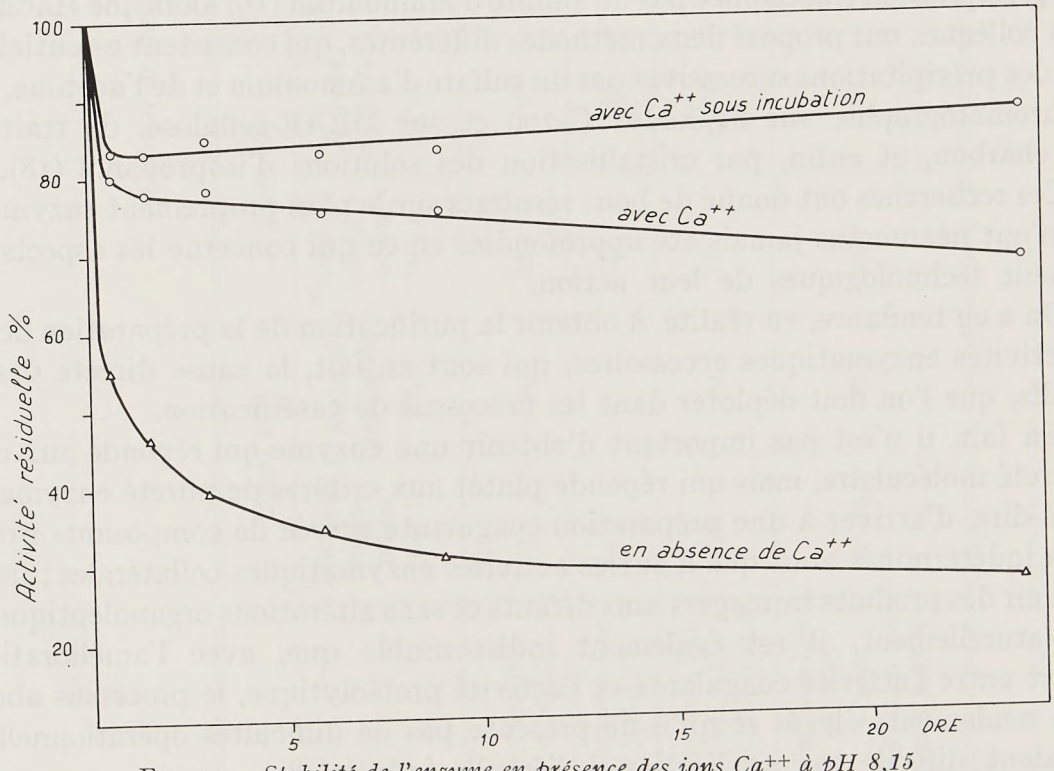


FIG. 3. — *Stabilité de l'enzyme en présence des ions Ca^{++} à pH 8,15*

et à 2,8°C (± 0,2) — sont reportés dans le tableau 2 et sont représentés dans la figure 3.

La réduction de l'activité de l'enzyme est particulièrement sensible au cours de la première heure ; après 40′ du début de l'expérience, il ne reste que les 55 p. 100 de l'activité originale de l'enzyme et, après 90′ il ne reste que 46 p. 100.

A la sixième heure, l'activité se stabilise à des valeurs proches des 30 p. 100 de la valeur initiale.

Lorsque l'expérience est répétée en présence d'ions calcium ajoutés sous forme de chlorure, l'on remarque un effet nettement positif sur la stabilité de l'enzyme.

Dans un milieu tamponné *Tris*-HCl, pH 8,15 0,025 M contenant $CaCl_2$ 0,001 M, l'enzyme perd seulement 20 p. 100 de son activité au cours des 40 premières minutes ; l'activité baisse ensuite très lentement au cours des temps successifs ; en se fixant après 24 heures autour de 70 p. 100 environ de la valeur d'origine.

Cette expérience recommencée avec une solution enzymatique sous incubation pendant 15 heures, avec $CaCl_2$ 0,01 M, a démontré que la stabilité de l'enzyme augmente ultérieurement. En ce cas, après une perte de stabilité initiale, qui est néanmoins toujours inférieure à celle constatée au cours de l'expérience précédente, l'activité montre une tendance à reprendre au cours des 24 heures suivantes pour se fixer à des valeurs proches du 90 p. 100 de l'activité initiale.

Toutefois, il n'est pas encore possible de formuler une hypothèse sur le mécanisme de l'action du calcium, mais il est vraisemblable qu'il s'agit d'une stabilisation de la structure protéique de l'enzyme.

PRÉPARATION DE L'ENZYME COAGULANTE D'*ENDOTHIA PARASITICA*

La purification de l'enzyme coagulante de l'*Endothia parasitica*, a été récemment abordée par différents chercheurs. SARDINAS s'est limité à l'étude de l'action normale de la précipitation fractionnée par du sulfate d'ammonium (19) alors que HAGEMEYER et ses collègues ont proposé deux méthodes différentes, qui consistent essentiellement dans des précipitations successives par du sulfate d'ammonium et de l'acétone, suivies de chromatographie sur Sephadex G-100 et sur DEAE-cellulose, de traitements avec charbon, et enfin, par cristallisation des solutions d'isopropanol (18).

Ces recherches ont donné de bons résultats sur le plan proprement enzymatique, elles n'ont néanmoins jamais été approfondies en ce qui concerne les aspects exclusivement technologiques de leur action.

On a eu tendance, en réalité, à obtenir la purification de la préparation de toutes ces activités enzymatiques accessoires, qui sont en fait, la cause directe des effets négatifs, que l'on doit déplorer dans les processus de caséification.

En fait, il n'est pas important d'obtenir une enzyme qui réponde aux critères de pureté moléculaire, mais qui réponde plutôt aux critères de pureté enzymatique ; c'est-à-dire, d'arriver à une préparation coagulante privée de composants protéolytiques indéterminés ainsi que d'autres activités enzymatiques collatérales ; de façon à obtenir des produits fromagers sans défauts et sans altérations organoleptiques.

Naturellement, il est également indispensable que, avec l'amélioration du rapport entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique, le processus aboutisse à des rendements élevés et qu'il ne présente pas de difficultés opérationnelles qui rendraient difficile son application à l'échelle industrielle.

TABLEAU 2

Épreuve de stabilité à pH 8,15 en présence de l'ion Ca^{++}

	Après 40′		Après 90′		Après 3 h		Après 6 h		Après 9 h		Après 24 h	
	Temps de coagulation (sec.)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (sec.)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (sec.)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (sec.)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (sec.)	Activité résiduelle (%)	Temps de coagulation (sec.)	Activité résiduelle (%)
Contrôle (pH 4,5)	32	100	31	100	32	100	32	100	32	100	32	100
Tampon *Tris* (pH 8,15)	58,5	55	70	46	81	39,5	93	34,5	105	30,5	134	24
Tampon *Tris* pH 8,15 + $CaCl_2$ 0,01 M	40	80	41	78	38	84,5	39	82	38,5	83	35,5	90
Tampon *Tris* pH 8,15 + pré-incubation avec $CaCl_2$ 0,01 M	38 - 38,5	83,5	38,5	83	38,5	83	42,5	75,5	42,5	75,5	47	68

Les caractéristiques de la préparation enzymatique commerciale qui est, entre autres, fortement impure et électrophorétiquement très hétérogène, nous ont suggéré de tenter une purification de la préparation au moyen de l'utilisation d'une résine carboxylique (34).

Au cours d'une recherche préalable, il a été constaté que l'enzyme coagulante produite par l'*Endothia parasitica* était absorbée facilement par des résines à échange ionique comme la phospho-cellulose, la diéthylaminoéthyl-(DEAE-) Sephadex, la DEAE cellulose, la carboxyméthyl-(CM-) Sephadex et la CM-cellulose.

La CM-cellulose nous a donné les meilleurs résultats, notamment en ce qui concerne le rendement enzymatique. Cela est en opposition avec les résultats de HAGEMEYER et de ses collègues (18) qui ne réussissent pas à observer cette enzyme sur CM-cellulose, en raison du fait que, le conditionnement de la résine par ces collègues avait été réalisé avec un tampon à molarité double de celle adoptée par nous-mêmes.

Dans nos essais nous avons expressément évité les méthodes de précipitation fractionnée, qui avaient été utilisées par nombre de collègues (18,19) parce que ces méthodes conduisent presque toujours à de fortes pertes d'activité enzymatique, sans que se vérifie, pour autant, une correspondante et sensible augmentation de l'activité spécifique, et donc sans que cela puisse constituer en soi un avantage tangible.

La préparation enzymatique brute était dialysée contre un tampon acétique à 0,005 M pH 4,6. Après avoir constaté au moyen du conductomètre la dialyse complète, on a placé la solution enzymatique sur colonne CM-cellulose équilibrée dans le même tampon acétique.

Les dimensions de la colonne étaient de 15 × 250 mm.

L'élution était conduite au moyen d'un gradient de concentration linéaire, réalisée également avec le tampon acétique à molarité 0,005 (300 ml) et 0,05 (300 ml).

Un profil typique de l'élution chromatographique est représenté dans la figure 4.

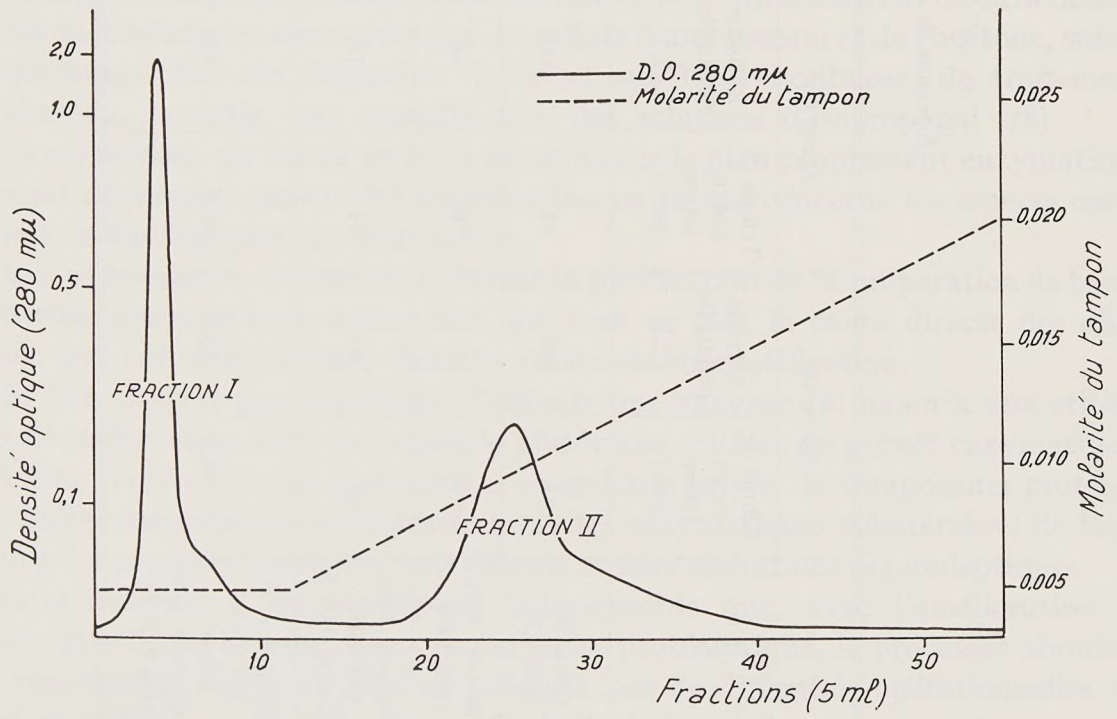


FIG. 4. — *Profil d'une élution chromatographique de la préparation enzymatique sur CM-cellulose*

TABLEAU 3

Purification de l'enzyme coagulante produite par Endothia parasitica

Fractions	Protéines totales (mg)	Activité protéasique (unité)	Activité coagulante (unité)	Rapport de l'activité coagulante à l'activité protéasique	Activité coagulante spécifique (unité/mg)	Rendement %	Purification (nb de fois)
1. Préparation dissoute et dialysée	125,4	4 350	4 800	1,10	384	100	1
2. Fraction I	40,6	705	522	0,74	13	11	—
3. Fraction II	40,4	2 950	3 350	1,13	838	70	2,2

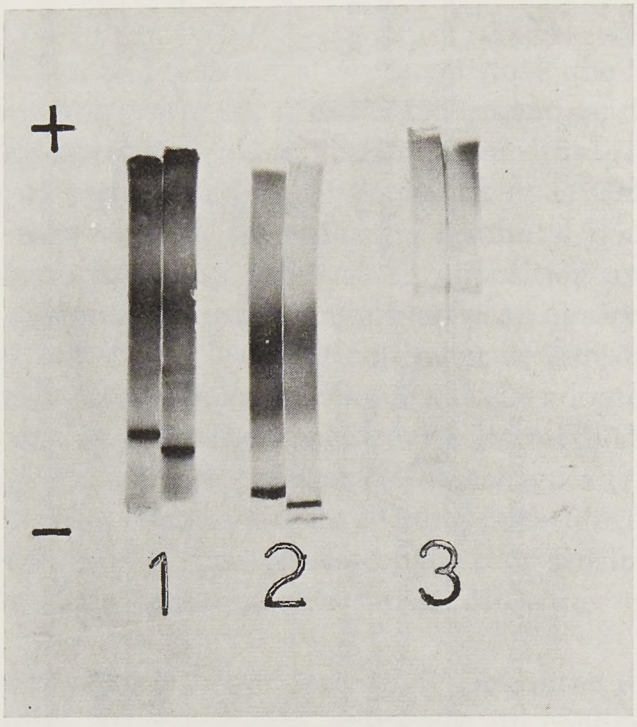


FIG. 5. — *Électrophorégramme sur polyacrilamide de la préparation initiale d'enzyme et des fractions chromatographiques*

1. Enzyme initiale dialysée ; 2. fraction I ; 3. Fraction II

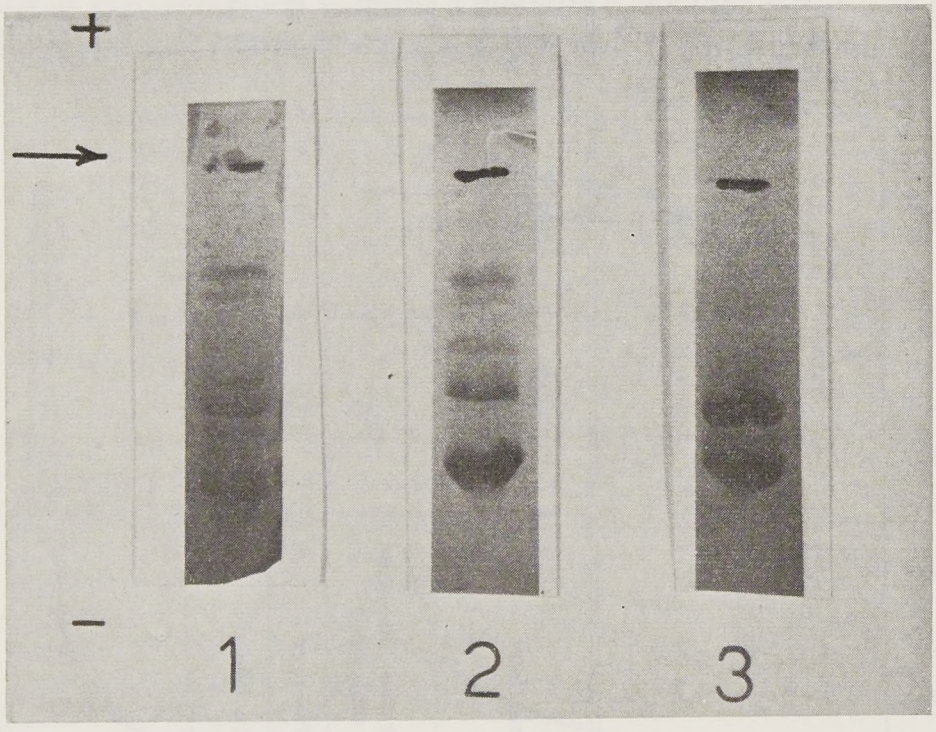


FIG. 6. — *Électrophorégramme sur acétate de cellulose de la caséine coagulée par l'enzyme initiale* (1) *et les fractions I* (2) *et II* (3)

Ce dernier démontre que la dite élution conduit à la séparation des deux fractions principales (fraction I et fraction II) qui possèdent également l'activité protéolytique et le pouvoir coagulant, mais en proportion différente (tabl. 3). Les pigments de couleur jaune-brun ne sont pas retenus par la résine, mais mis en élution avec la fraction I.

Dans la figure 5, où sont reproduits les électrophorégrammes sur polyacrylamide de l'enzyme brute, de la fraction I et de la fraction II, l'absence d'homogénéité des électrophorégrammes dans les deux fractions considérées est évident.

Les électrophorégrammes effectués sur acétate de cellulose de la caséine coagulée de l'enzyme brut, de la fraction I et de la fraction II, sont représentés dans la figure 6.

Les électrophorégrammes ont été effectués en additionnant 20 ml de lait aux 2 ml des trois préparations enzymatiques diluées, de façon que chacune des préparations puisse contenir le même nombre d'unités enzymatiques.

Après la coagulation on centrifuge ; puis le précipité est à nouveau dispersé dans le tampon contenant l'urée.

L'examen des composants électrophorétiques, permet de noter clairement comment l'enzyme brute et la fraction I, à égalité d'activité coagulante, présentent une activité protéolytique supérieure à celle qui est caractéristique de la fraction II.

Cette dernière fraction, tout en possédant une importante activité protéolytique, ne provoque pas, dans les conditions expérimentales ci-dessus mentionnées, la formation de composants électrophorétiques différents de l'α- et de la β-caséine.

L'activité électrophorétique comparative des produits obtenus avec la chimase traditionnelle a fait ressortir que cette fraction présente certains caractères communs à la chimase de veau. Ce résultat suggère que l'utilisation dans la technologie fromagère de la fraction II de l'enzyme peut offrir par rapport à l'enzyme brute, des avantages d'une valeur pratique substantielle, même dans le cas où l'on arrive à une conclusion définitive sur ces arguments, après réalisation préalable d'essais de caséification.

Tout récemment, une méthode intéressante de purification au moyen d'électrophorèse préparatoire, qui présente différentes analogies avec des résultats de cette présente recherche, a été mise au point par Resmini et ses collègues (7).

La méthode de purification qui a été utilisée par nous-même comportait une dialyse prolongée contre tampon acétique pH 4,6 0,005 M. Étant donné que cette dialyse nécessitait, même avec les meilleures conditions expérimentales, de 72 à 96 heures, nous avons étudié une nouvelle série d'essais de gel-filtration sur différents types de Sephadex ; ceci dans le but de réduire le temps nécessaire à la dialyse, de façon à rendre cette opération réalisable à l'échelle technologique et obtenir, par cette voie, une purification plus poussée de l'enzyme (35).

Pour effectuer la chromatographie sur Sephadex, l'enzyme était préalablement dialysée contre tampon acétique 0,02 M pH 4,6 et ce, jusqu'à sa complète dissolution, dans le but de réduire le contenu salin excessif de la préparation brute.

En raison de l'insuffisante solubilité du matériau, cette opération nécessitait entre 5 et 8 heures de temps.

Dans la figure 7 sont reportés les profils de la gel-filtration de l'enzyme sur Sephadex G-75, sur Sephadex G-100 et sur Sephadex G-200.

Par les valeurs de densité optique et de l'activité coagulante, il apparaît que les trois Sephadex conduisent à une bonne purification de l'enzyme coagulante. Si la

complète séparation des autres substances à haute molarité est possible uniquement sur la Sephadex G-200, l'élimination complète des impuretés de poids moléculaire inférieur à celui de l'enzyme, s'effectue seulement avec l'utilisation de G-75.

La Sephadex G-100 permet dans l'ensemble, la meilleure purification, même si dans les fractions qui présentent une activité coagulante il reste d'importantes impuretés soit de haute, ou de basse molarité.

Dans la figure 8 est reporté le profil de la gel-filtration de l'enzyme sur colonnes réunies de Sephadex G-75 et G-200.

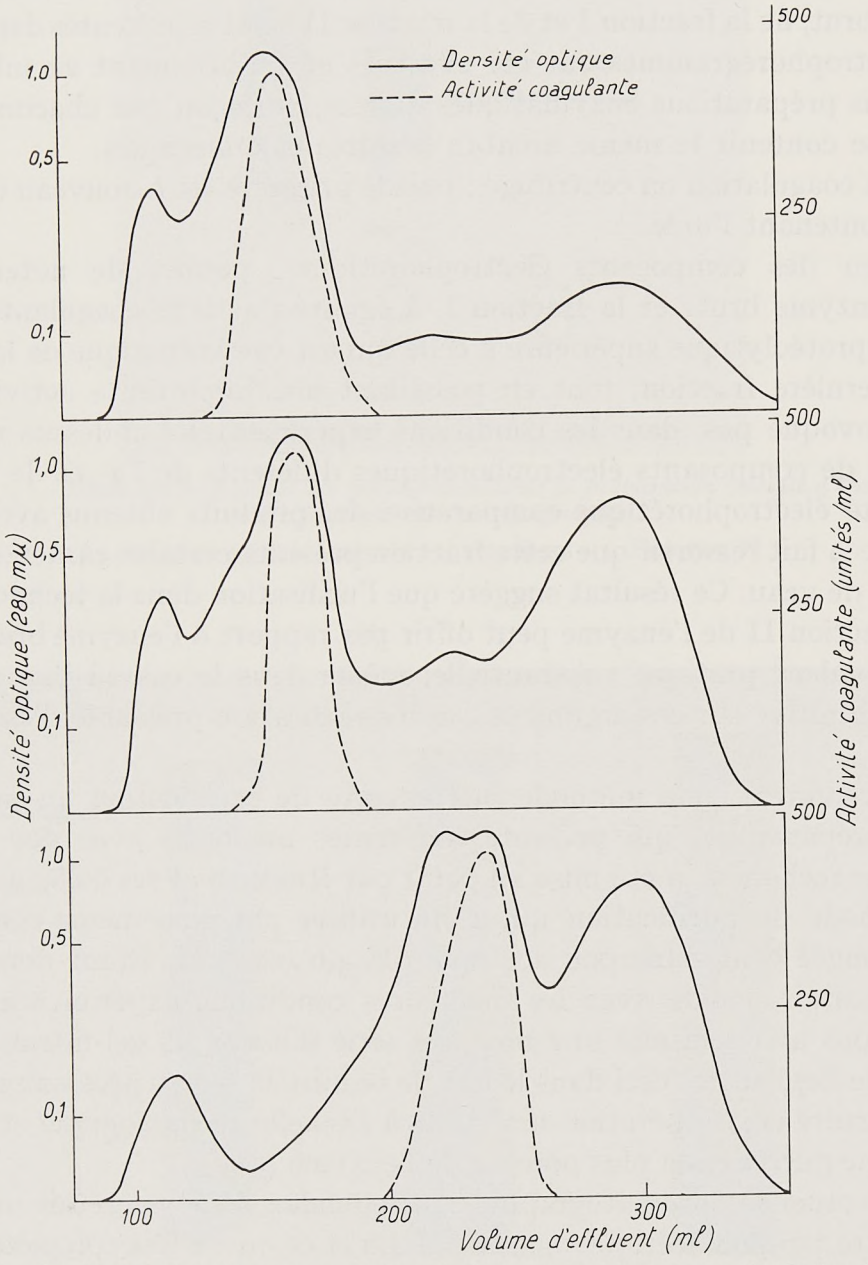


FIG. 7. — *Profil d'élution chromatographique de l'enzyme coagulante sur Sephadex G 75* (a), *sur Sephadex G 100* (b), *et sur Sephadex G 200* (c)

Du déroulement des valeurs de la densité optique et de l'activité coagulante dans le profil de l'élution chromatographique, il résulte que le procédé donne lieu à une excellente séparation de l'activité enzymatique des impuretés de haute et de basse molarité, qui ne sont pas séparables dans le même temps sur colonnes séparées.

TABLEAU 4

Purification de l'enzyme coagulante produite par Endothia parasitica
Les données sont rapportées à 1 g de la préparation enzymatique non purifiée

	Protéines totales (mg)	Activité coagulante (unité)	Activité protéolytique (unité)	Rapport activité coagulante sur activité protéolytique	Activité coagulante spécifique (unité/mg)	Rendement %	Purification (nb de fois)
1. Préparation dissoute et dialysée	251,1	9,600	8,850	1,08	38,23	—	—
2. Enzyme purifiée sur Sephadex	112,5	8,750	7,950	1,10	77,77	91,15	2,03
3. Enzyme purifiée sur CM-cellulose (fraction II) .	51,4	5,150	2,550	2,02	100,19	53,66	2,62

L'enzyme purifiée sur Sephadex double son activité spécifique, avec un rendement supérieur à 90 p. 100 et il ne se produit pas de variations sensibles du rapport entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique (tabl. 4).

Certains essais effectués sur différents Sephadex au moyen de tampons de force ionique différente, n'ont pas donné une meilleure résolution des différentes fractions, en ajoutant du chlorure de sodium au tampon.

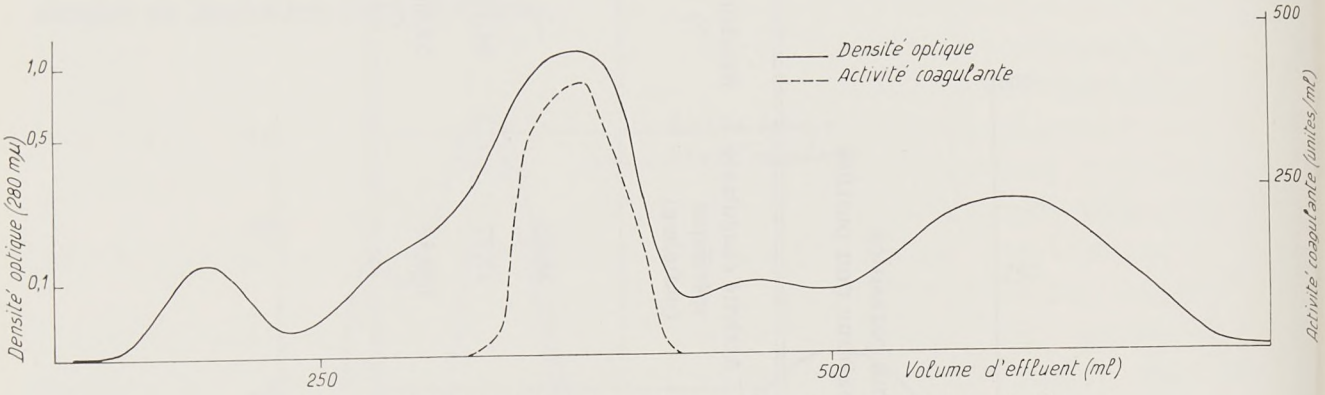


FIG. 8. — *Profil d'élution chromatographique de l'enzyme coagulante sur colonnes jumelées de Sephadex G 75 et G 200*

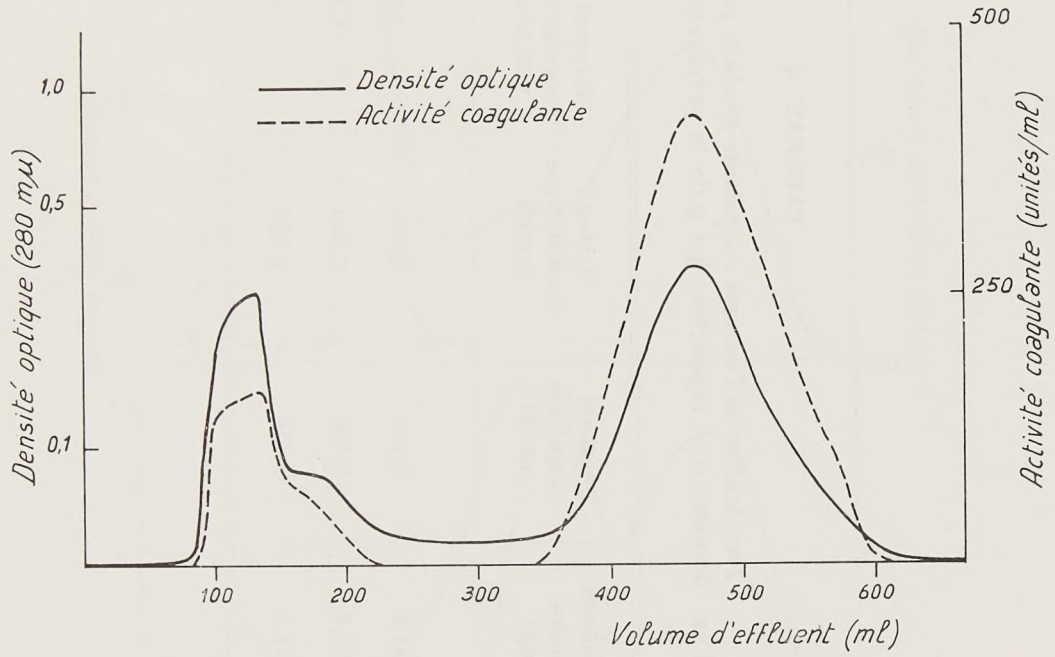


FIG. 9. — *Profil d'élution chromatographique sur* CM-cellulose *de l'enzyme coagulante préalablement purifiée sur Sephadex*

Des phénomènes d'absorption partielle de la part de la résine se manifestaient seulement lorsque la molarité du tampon dépassait 0,02.

Dans la figure 9, est reporté le profil de la chromatographie sur CM-cellulose de l'enzyme purifié préalablement sur Sephadex ; chromatographie qui, par ailleurs n'a pas été effectuée comme d'habitude avec le gradient de concentration, mais au moyen d'élutions successives, et cela dans le but de parvenir à une forme d'application plus pratique du procédé dans le cas où seraient demandées des quantités puls élevées d'enzymes.

Par rapport à la méthode précédente, nous avons donc procédé de la façon suivante :

La solution enzymatique purifiée sur Sephadex était ensuite diluée avec quatre parties d'eau et placée directement sur la colonne qui, elle, est conditionnée avec tampon acétique 0,005 M pH 4,6.

Dans ces conditions, on élue la fraction I qui correspond à des activités enzymatiques dans lesquelles le rapport entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique apparaît relativement bas (34).

L'élution de la fraction I est ensuite complétée avec tampon acétique 0,005 M.

La fraction II, retenue par la résine, est éluée avec tampon acétique 0,025 M.

L'électrophorèse sur polyacrylamide montre que dans cette fraction se trouve encore présent un mélange hétérogène de protéines.

L'activité enzymatique coagulante apparaît toutefois considérablement purifiée, surtout pour des utilisations proprement technologiques.

Le rapport entre l'activité coagulante et l'activité protéolytique dans la fraction purifiée est d'environ deux fois celui constaté dans la préparation initiale (tabl. 4).

Le rendement du procédé de purification, donne un résultat égal à 54 p. 100 environ. Comparé à celui — environ 10 p. 100 — obtenu par d'autres collègues (18), il apparaît considérablement élevé.

Avec la préparation enzymatique ainsi purifiée ont été effectués différents essais de caséification ; certains de ces essais sont encore en cours d'expérimentation.

L'on se propose donc de suivre les variations des propriétés organoleptiques des produits fromagers, au cours du processus de maturation.

Les résultats de ces dernières recherches seront fournis dans une prochaine note.

SUMMARY

STUDIES ON MILK-CLOTTING ENZYME OF *ENDOTHIA PARASITICA*

Some results are exposed of a study on isolation, purification and properties of milk-clotting enzyme produced by *Endothia parasitica*. The enzyme shows maximal stability at pH 4,5 and in the presence of calcium ions.

A simple procedure for purifying the crude enzyme involves a brief dialysis, a gel filtration on twined columns of Sephadex G-75 and G-200 and a CM-cellulose chromatography. Some proteolytic enzymes and inactive proteins are removed from the milk-clotting activity. The procedure is very suitable even on a preparative scale.

ZUSAMMENFASSUNG

UNTERSUCHUNG ÜBER DAS AUS *ENDOTHIA PARASITICA* HERGESTELLTE, MILCHGERINNENDE ENZYM

Einige Ergebnisse einer Untersuchung über die Isolierung, Reinigung und Eigenschaften von aus *Endothia-parasitica* hergestellten, milchgerinnendem Enzym werden aufgezeigt. Dieses Enzym zeigt eine maximale Stabilität bei pH 4,5 in Gegenwart von Calciumionen.

Ein einfaches Reinigungsverfahren des Enzyms führt zu einer kurzen Dialyse, einer Gel-

Filtrierung auf Doppelkolonnen Sephadex G 75 und G 200 und einer Chromatographie auf CM-Zellulose. Einige proteolytische Enzyme und nichtaktive Proteine sind ausgeschlossen von der milchgerinnenden Aktivität. Dies Verfahren ist äusserst wirksam, selbst im Vorbereitungsstadium.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Rotini O. T., 1930. Ricerche sulla chimasi batterica della *Rapidase*. *Ann. Lab. Lazzaro Spallanzani*, **1**, 191.

(2) Rotini O. T., 1930. La chimasi dell' *Aspergillus oryzae*. *Ann. Lab. Lazzaro Spallanzani*, **1**, 175.

(3) Rotini O. T., 1931. Seconda rassegna della chimasi. *Ann. Lab. Lazzaro Spallanzani*, **2**, 405.

(4) Rotini O. T., 1957. L'influenza dei cianati sulla coagulazione presamica del latte. *Ann. Fac. Agr. Pisa*, **18**, 69.

(5) Annibaldi S., Nizzola I., 1969. Indagini preliminari sull'estratto enzimatico coagulante Noury ottenuto da *Mucor pusillus*. *Lindt. Scienza e Tec. Latt. Cas.*, **20**, 129.

(6) Annibaldi S., Nizzola I., 1969. Esperienze di fabbricazione di formaggio parmigiano-reggiano con Suparen Pfizer. Nota I. *Scienza e Tec. Latt. Cas.*, **20**, 271.

(7) Resmini P., Volonterio G., Saracchi S., Bozzolati M., 1971. Studio sull'enzima coagulante il latte estratto da *Endothia parasitica*. I. Sua purificazione ed utilizzazione nella purificazione di formaggio tipo Taleggio. *Industrie Agrarie*, **9**, 6.

(8) Alais C., Novak G., 1968. Étude d'une enzyme coagulante microbienne dérivé de *Endothia parasitica*. Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulante Pfizer et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait. *Le lait*, **48**, 393.

(9) Ramet J.-P., Alais C., Weber F., 1969. Étude d'une enzyme coagulante microbienne dérivée de *Endothia parasitica*. II. Fabrications expérimentales de fromages à pâte cuite avec l'enzyme coagulante Pfizer. *Le lait*, **49**, 40.

(10) Desmazeaud M., Hermier J., 1968. Facteurs intervenant dans la production du système protéolitique chez *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 419.

(11) Desmazeaud M., Hermier J., 1968. Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseoyticus*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 565.

(12) Somkuti G. A., Babel F. J., 1969. Production of *Mucor pusillus* acid protease reconstituted whey. *J. Dairy Sci.*, **52**, 535.

(13) Iwasaki S., Yasui T., Tamura G., Arima K., 1967. Milk clotting enzyme from microorganisms. III. The purification of the enzyme and its properties. *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), **31**, 1421.

(14) Yu J., Tamura G., Arima K., 1969. Milk clotting enzyme from microorganisms. VI. Properties of crystalline milk-clotting enzyme (*Mucor rennin*) isolated from *Mucor pusillus* var. lindt. *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 138.

(15) Arima K., Yu J., Iwasaki S., Tamura G., 1968. Milk-clotting enzyme from microorganisms. V. Purification and crystallization of *Mucor rennin* from *Mucor pusillus* var. lindt. *Appl. Microbiol.*, **16**, 1727.

(16) Arima K., Iwasaki S., 1967. Microbial rennet from *Mucor pusillus*. *Japan Pat.* 22179.

(17) Shovers J., Bavisotto V. S., 1967. Fermentation-derived enzyme substitute for animal rennets. *J. Dairy Sci.*, **50**, 942.

(18) Hagemeyer K., Fawwal I., Whitaker J. R., 1968. Purification of protease from the fungus *Endothia parasitica*. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1916.

(19) Sardinas J. L., 1968. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.*, **16**, 248.

(20) Sardinas J. L., 1966. Milk-curdling enzyme elaborated by *Endothia parasitica*. *U. S. Pat.*, **3**, 275-453.

(21) Schulz M. E., Voos E., Sell H., Mrowetz D., 1969. Problematik und erste Prüfungergebnisse für das japanische *Mucor pusillus* lindt Lab. *Milchwissenschaft.*, **22**, 139.

(22) Edelsten D., Hamdy A., El Kousy L., 1969. A study of microbial milk coagulating enzymes. *Kgl. Vet. Landboejskole Arsskr.*, 201.

(23) Kikuchi T., Tadafu S., Toyoda S., Sukegawa K., 1968. Microbial rennet. II. Experimental production of Edam cheese with microbial rennets. *Yuchijrushi Nvogyo Gijutsu Kenkvujo Hokoru*, **70**, 7.

(24) De Koning P. J., Van Rooijen P. J., Kok A., 1969. Characterization of mixtures of calf rennet and rennet substitutes. *Neth. Milk Dairy J.*, **23**, 55.

(25) Vamos-Vigyazo L., Poszar-Hajnal K., Gegedus-Volgyesi E., 1969. Tejalvasztó hatàsù enzimek vizgàlata sajtgyàrtàs szempontjaból. I. A tejalvasztó és proteolitikus aktivitàs mérése *Elelmiszertudomàny*. **3**, 13.

(26) Puhan Z., 1969. Protease composition of a rennet substitute from *Bacillus subtilis* and properties of its component proteases. *J. Dairy Sci.*, **52**, 1372.

(27) Melachouris N., Tuckey S. L., 1968. Properties of a milk-clotting microbial enzyme. *J. Dairy Sci.*, **51**, 650.

(28) Kikuchi T., Tadafuji S., Toyoda S., Suzuki Y., 1968. Microbial rennet. I. Characteristics of microbial rennets. *Yuchijurshi Nyogyo Gijutsu Kenkyujo Hokoku*, **70**, 1.

(29) Srinivasan R., Anantharamiah S. N., Ananthakrishna C. P., 1968. Milk clotting bacterial enzyme for cheese manifacture. IV. Use of enzyme produced by *Streptococcus liquefaciens* (*Streptococcus foecalis* var. *liquefaciens*). *Indian J. Dairy Sci.*, **21**, 149.

(30) Dimitrov D., Veselov J. V., Petina T. A., Martirosova L. A., 1969. Formation of protease and milk-clotting enzyme during the submerged cultivation of *Aspergillus candidus* strain II. *Prikl. Biokhim. Microbiol.*, **5**, 47,

(31) Wang H. L., 1967. Release of proteinase from mycelium of *Mucor hiemalis*. *J. Bacteriol.*, **93**, 1794.

(32) Arima K., Yu J., Iwasaki S., 1970. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. lindt. *Methods in Enzymology*, **19**, 446.

(33) Sequi P., Rotini O. T., 1970. Indagini sull' enzima coagulante prodotto dall' *Endothia parasitica* I. Stabilità dell'enzima in funzione del pH, della temperatura e degli ioni calcio. *Agrochimica*, **14**, 379.

(34) Rotini O. T., Sequi P., 1970. Indagini sull'enzima coagulante prodotto dall'*Endothia parasitica*. II. Purificazione su resina carbossilica. *Agrochimica*, **14**, 386,

(35) Sequi P., Petruzzelli G., Rotini O. T. Sull'enzima coagulante dell' *Endothia parasitica*. XIII Ulteriore purificazione dell'enzima. *Agrochimica* (in corso di pubblicazione).

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 385-422.

ENZYMES ET TENDRETÉ DES VIANDES

M. HENRY

Laboratoire central,
Société Olida et Caby, 114 rue Baudin,
92 - Levallois-Perret (France)

RÉSUMÉ

Une carcasse de bœuf renferme autant de morceaux à cuisson lente (35 p. 100 environ) que de morceaux à cuisson rapide (35 p. 100 environ) et les améliorations génétiques des animaux (conformation, précocité) ou d'élevage (état d'engraissement) ne modifient que très peu ces proportions. Or, on assiste à une demande sans cesse croissante des consommateurs pour les morceaux à griller ou rôtir au préjudice de ceux à braiser ou bouillir, ce qui pose le problème de l'utilisation de la « basse ». (A noter que celui-ci est aggravé, en France, du fait que la consommation de steaks ou rôtis de viande hachée de bœuf, de 2e catégorie, ne se développe que très lentement.)

La possibilité qu'offre l'utilisation d'enzymes pour attendrir la viande nécessitant normalement une cuisson longue est donc d'un grand intérêt sur le plan économique. Cependant si la tendreté de la viande est la principale qualité organoleptique demandée par les consommateurs, sa mesure objective pose encore des problèmes. Par ailleurs, de multiples facteurs : biologiques, technologiques et culinaires influencent la tendreté (ou à l'opposé la dureté) de la viande. Il nous a paru intéressant de les passer en revue car les activités enzymatiques du tissu musculaire jouent un rôle de premier plan dans l'attendrissage et leur bonne connaissance permet : soit d'en tirer un meilleur profit, soit d'en ajouter les effets propres à ceux des enzymes apportés par l'Homme, soit de mettre au point des mélanges d'enzymes reproduisant aussi fidèlement que possible les processus enzymatiques de la « maturation » naturelle.

Les enzymes actuellement utilisées pour attendrir la viande sont des protéases d'origine fongique et, plus fréquemment, d'origine végétale (papaïne, ficine, broméline). L'injection de papaïne aux animaux avant l'abattage est un cas particulier de leur utilisation qui prend une grande extension aux U. S. A., Canada et Grande-Bretagne notamment. De nombreuses poudres enzymatiques sont vendues à l'étranger pour attendrir la viande avant et durant la cuisson. Une composition type de ces poudres est la suivante : protéases fongiques (5 p. 100), papaïne (2 p. 100), dextrose (15 p. 100), glutamate monosodique (2 p. 100) et chlorure de sodium. Cependant, en France, la réglementation est très restrictive puisque le seul « sel attendrisseur » autorisé (renfermant 2 à 3 p. 100 de papaïne) est exclusivement réservé à la consommation domestique (Circulaire du Ministère de l'Agriculture du 25 janvier 1955).

INTRODUCTION

Parmi les qualités organoleptiques des viandes dont tiennent compte les professionnels qui vivent de son commerce, on peut citer : la couleur, la texture des fibres musculaires et du conjonctif, l'adiposité (graisses de couverture et intramus-

culaires) et les qualités physiques des graisses, le degré de fermeté et l'humidité apparente. Quant aux consommateurs, ils attachent surtout de l'importance à la tendreté conjointement, parfois, à la succulence et au goût. Les laboratoires de recherches sur les viandes s'efforcent d'évaluer — objectivement — la tendreté — ou à l'opposé la dureté — (ce qui prête parfois à confusion) de la viande, alors que les consommateurs apprécient ces caractères suivant la plus ou moins grande facilité avec laquelle la viande se laisse cisailler, dilacérer et broyer par l'appareil dentaire. Entre la viande très tendre et celle très dure il existe tous les intermédiaires. L'art culinaire intervient pour beaucoup dans la tendreté de la viande et on l'oublie trop souvent. Il est vrai que l'on cuisine de moins en moins la viande et on constate (THOUVENOT, 1971) que même dans les campagnes déshéritées, les bouchers éprouvent de plus en plus de difficultés à vendre les morceaux de 2e catégorie (viandes à braiser) et plus encore de 3e catégorie (viandes à bouillir) du fait de l'attirance sans cesse croissante des consommateurs vers les morceaux de 1er catégorie (viandes à griller et à rôtir). Malheureusement, comme le souligne CRAPLET (1966), la carcasse des bovins renferme autant de morceaux à cuisson lente que de morceaux à cuisson rapide (35 p. 100 environ du poids de la carcasse dans chacun des cas). Certes, l'amélioration constante des procédés d'élevage accroît le rendement carcasse (poids de la carcasse/sur poids vif), celui-ci pouvant varier de 45 p. 100 (vache de réforme en mauvais état) à 65 p. 100 (bœuf de 1re qualité) et il en résulte que la viande commercialisable représente 30 à 45 p. 100 du poids vif. Cependant, il semble difficile de trouver une solution zootechnique vraiment révolutionnaire au problème de l'accroissement relatif du pourcentage de morceaux à cuisson rapide. L'exemple du rôle du sexe, réputé jouer pour beaucoup, est instructif : la vache donne environ 52 p. 100 de morceaux à cuisson rapide (donc 48 p. 100 de morceaux à cuisson lente), le bœuf donne 51 p. 100 de morceaux à cuisson rapide, le baby-beef 50 p. 100 et le taureau 49 p. 100. Le poids vif intervient encore moins. Quant à l'âge des animaux il permet surtout au boucher de tirer un meilleur profit de la « viande marginale » (morceaux justiciables d'une cuisson intermédiaire entre rapide et lente), les bovins les plus intéressants à ce point de vue étant ceux de 2 ans environ. Tel est sur le plan économique le « drame du bifteck » singulièrement aggravé en France du fait que la consommation de steaks ou rôtis de viande hachée, demandant normalement une cuisson longue, ne se développe que très lentement. L'intérêt économique des recherches technologiques visant à augmenter le pourcentage relatif des morceaux à cuisson rapide est donc considérable. Cependant il se pose une question préliminaire : *comment apprécier objectivement la tendreté* ?

La notion de tendreté de la viande est loin d'être aussi évidente qu'on l'imagine volontiers et les méthodes pour l'apprécier ne sont pas encore très satisfaisantes. Rappelons que, dans la pratique, elles reposent sur une appréciation subjective par les professionnels, en ce qui concerne la viande crue, ou par un jury de dégustateurs (« taste panel test ») pour la viande cuite et plus rarement sur des enquêtes statistiques effectuées directement auprès d'un grand nombre de consommateurs. En effet les procédés objectifs (physiques, chimiques, histologiques) visant à mesurer la tendreté (ou à l'opposé la dureté) de la viande, sont encore du domaine du laboratoire. Or, l'opinion d'un jury de dégustateurs ne permet de dégager qu'une tendance générale. Ainsi DUMONT (1966) estime-t-il que sur la base d'un classement en : « très tendre », « tendre », « moyenne », « légèrement dure », « assez dure » et « très dure », un jury de

10 personnes répondra ainsi : « tendre » : 5 réponses, « très tendre » : 2 réponses, « moyenne » : 2 réponses, « légèrement dure » : 1 réponse. Par ailleurs les principes sur lesquels sont basés les appareils de mesure objective de la tendreté sont encore trop nombreux pour permettre la comparaison des résultats : mesure de la force nécessaire pour perforer la viande avec un cône standardisé (pénétromètre) ; mesure de la force nécessaire à l'étirement (jusqu'à la rupture) d'un morceau de viande ; mesure de la force nécessaire à l'écrasement de la viande entre deux dents ou entre deux mors, l'un rigide et l'autre déformable ; évaluation du travail nécessaire pour déchiqueter la viande dans un appareil dont les mâchoires sont animées alternativement d'un mouvement vertical puis horizontal ; mesure de l'énergie dépensée et du travail effectué par un petit hachoir électrique (appareil de DUMONT) ; mesure de la force nécessaire au cisaillement d'un morceau de viande (principe de la guillotine). Ce cisaillement de la viande est réalisé dans l'appareil de WARNER-BRATZLER qui est le plus fréquemment utilisé. On peut ainsi comparer entre eux des résultats expérimentaux présentés dans les communications sous l'expression « WARNER-BRATZLER Shear Force ». A signaler cependant que SALE *et al.* (1970) reprochent à cet appareil de ne pas évaluer une pure force de cisaillement et qu'ils ont mis au point un appareil réalisant un pur cisaillement de la viande avec mesure du travail accompli. Enfin DUMONT (1971) démontre que l'index de « Shear Force » du bœuf, évalué avec l'appareil de WARNER-BRATZLER, pose avant tout le choix des muscles à tester. En particulier l'index du *Longissimus dorsi* (muscle facile à prélever sur les carcasses et généralement utilisé) n'est pas en étroite corrélation avec l'index des autres muscles de la carcasse. De plus les variations de tendreté entre animaux de mêmes muscles semblent relativement aléatoires. Il résulte de tout ceci que les corrélations entre les résultats des méthodes objectives et ceux des jurys de dégustateurs ne sont pas très significatives. Cependant GACULA *et al.* (1971) ont étudié des modèles statistiques tant pour l'appareil de WARNER-BRATZLER que pour les jurys de dégustateurs, ayant l'avantage de minimiser les facteurs de variation étrangers aux données expérimentales, d'où il s'ensuit de meilleures corrélations. Enfin, tout récemment, HANSEN (1971) a fait part des résultats qu'il a obtenu avec un appareil dénommé « tendéromètre » conçu pour prédire la tendreté de la viande après cuisson bien que l'expertise porte sur des petits échantillons prélevés sur des carcasses en cours de maturation dans une salle froide d'abattoir. Enfin pour terminer cette incursion dans les méthodes d'appréciation de la tendreté des viandes, il est intéressant de signaler le travail de MICHAEL *et al.* (1971). Ces auteurs, qui ont opéré sur le *Longissimus* de bœuf, utilisent comme méthodes subjectives, d'une part l'appréciation d'un jury de dégustateurs et d'autre part l'appréciation à la vue et au toucher du « grain » de la viande (la texture de la viande est classée en : très grossière, grossière, faiblement grossière, faiblement fine, fine et très fine) et comme méthodes objectives : l'index « WARNER-BRATZLER Shear Force » et le degré de solubilité des protéines de la viande dans différentes solutions salines ainsi que la mesure de la longueur des sarcomères. L'étude de multiples droites de régression a montré que la combinaison : solubilité des protéines, plus texture et longueur des sarcomères était en corrélation dans 88 p. 100 des cas avec la « Shear Force » et dans 72 p. 100 des cas avec l'appréciation du jury de dégustateurs.

GÉNÉRALITÉS SUR LES FACTEURS EN CAUSE DANS LA TENDRETÉ DES VIANDES. INCIDENCE DES ENZYMES TISSULAIRES

Les viandes des bovins, ovins, porcins, posent à des degrés divers des problèmes de tendreté, principale qualité de la viande exigée par les consommateurs. Cette notion de qualité appréciée à différents stades successifs (bétail sur pied, carcasses chez le boucher ou le transformateur, morceau dans l'assiette du consommateur) est une question fort complexe. C'est pourquoi CRAPELET (1966) et DUMONT (1966) s'élèvent tous deux avec force contre la notion univoque de qualité reposant sur une classification en « Extra », « 1re qualité », « Choix » etc. exclusivement au niveau de l'animal vivant ou de la carcasse, car, ainsi que l'écrit DUMONT (1966) : « Quel rapport y a-t-il entre la qualité jugée par le consommateur et la qualité appréciée une heure après l'abattage par le qualificateur? Quelle évolution, jusqu'au stade culinaire inclus a connu les caractéristiques de la musculature ? » La même question est posée par JUILLERAT *et al.* (1971) à la suite d'un test de dégustation portant sur 950 familles. Ces auteurs arrivent en effet à la conclusion que l'appréciation de la qualité de la viande n'est pas en rapport étroit avec le « grade » (classification) des carcasses (système U. S. D. A) basé sur l'âge des animaux, leur conformation, le pourcentage de graisse intramusculaire et périrénale. C'est également l'avis de RHODES (1971) qui estime que les systèmes d'appréciation des carcasses en fonction de l'âge, la conformation, l'état d'engraissement, le poids et le sexe, n'ont que peu de valeur pour prédire des qualités culinaires de la viande. Par contre, BUCHTER *et al.* (1971) trouvent que le sexe des bovins est le facteur le plus étroitement en corrélation avec la tendreté du *Longissimus dorsi*, alors que c'est l'âge qui a le plus de répercussion sur la tendreté du *Semitendinosus* et du *Triceps brachii*. Quant à la conformation (qui ne varie guère qu'avec la sélection de bovins ou porcins « culards » et l'état d'engraissement) elle concerne surtout le rendement en viande des carcasses. KRYLOVA *et al.* (1971 *a*) ont également présenté une vaste étude sur les interrelations entre la flaveur, la succulence et la tendreté de la viande bovine et les caractéristiques physico-chimiques du muscle à l'état cru ou cuit (à 75°C à cœur). Ils concluent que la tendreté du *Longissimus dorsi* est en étroite corrélation avec la quantité d'eau résiduelle dans le muscle cuit ($P < 0{,}001$), sa perte de jus durant la cuisson, son contenu en collagène soluble et la « Shear Force » ($P < 0{,}01$ pour ces trois derniers facteurs), alors que la tendreté du *Semitendinosus* est surtout en corrélation avec le contenu en collagène soluble ($P < 0{,}001$)

Pour CRAPLET (1966) tous les problèmes organoleptiques que pose la conservation de la viande ou sa transformation industrielle, se ramènent à des réactions enzymatiques, les enzymes en cause appartenant en propre au tissu musculaire ou ayant pour origine des microorganismes. En fait de récentes recherches laissent soupçonner également l'existence de facteurs physico-chimiques agissant notamment au niveau des myofibrilles par modification du diamètre des fibres musculaires ou de la longueur des sarcomères.

On peut classer les différents facteurs en cause dans la tendreté des viandes en

facteurs physiologiques (intervenant avant l'abattage des animaux) et en facteurs technologiques intervenant *post mortem*. Ce sont : la capacité de rétention de l'eau de la viande, qui met en cause, *ante mortem*, des dérèglements endocriniens consécutifs aux modes de sélection et d'élevage, pouvant être aggravés par les conditions de transport des animaux, leur stabulation dans de mauvaises conditions avant l'abattage et l'abattage proprement dit ; les conditions dans lesquelles survient la rigidité cadavérique (*rigor mortis*) qui met en cause un grand nombre d'enzymes sarcoplasmiques, granulaires, membranaires et myofibrillaires et certains de leurs activateurs, notamment les ions calcium libérés par le réticulum sarcoplasmique ; les conditions de refroidissement, éventuellement de congélation-décongélation, ainsi que, le cas échéant, de pré-emballage de la viande, qui mettent en cause le raccourcissement des fibres musculaires (au sujet duquel la notion de « cold shortening » n'est pas à généraliser) et les enzymes actives durant le processus de résolution de la *rigor mortis* et celui de la « maturation » ; le rôle, encore mal connu, des enzymes d'origine microbienne ; la situation anatomique du muscle considéré, le mode de découpe, la texture (ou « grain ») de la viande et le problème du conjonctif dans son ensemble, la pigmentation des muscles et la teneur en lipides intramusculaires, qui mettent en cause des facteurs génétiques, nutritionnels et l'exercice musculaire ; enfin les conditions de cuisson qui peuvent activer ou inhiber des réactions enzymatiques et être responsables d'une perte plus ou moins importante de suc musculaire.

Ces différents facteurs en cause dans la tendreté des viandes vont être rapidement passés en revue.

CAPACITÉ DE RÉTENTION DE L'EAU ET TENDRETÉ DE LA VIANDE. CONTEXTE HORMONAL ET ENZYMATIQUE *IN VIVO*

Tous les cuisiniers savent bien qu'une viande (grillée, rôtie, braisée ou bouillie) qui perd beaucoup de jus à la cuisson est moins tendre que lorsqu'elle en perd peu. Mais il faut aller rechercher très loin les facteurs extra-culinaires susceptibles d'influencer la perte de jus à la cuisson.

Ainsi, JOSEPH (1970) dans une communication intitulée « Production du bœuf tendre », suggère-t-il que les conditions de transport à l'abattoir et d'abattage des bovins peuvent influencer les qualités organoleptiques de la viande comme cela a été constaté pour les porcins au cours des études sur l'état dit « PSE » (Pale, Soft, Exudative, — dénomination internationale —) de leur musculature squelettique. En effet, dès 1957, HENRY constatait une mobilisation du potassium cellulaire au cours de l'abattage électrique des porcs, pouvant être aggravée par les différents types de stress auxquels ces animaux sont soumis avant l'abattage. Pour HENRY ces déséquilibres hydro-ioniques, aboutissant à l'état PSE, s'inscrivaient dans un contexte hormonal caractéristique (HENRY *et al.*, 1958 et 1961) : déséquilibre des sécrétions de l'axe hypophyso-surrénalien avec diminution du rapport : hormones glucocorticoïdes (type cortisone) sur hormones minéralocorticoïdes (type aldostérone). Certaines races de porcs : *Landrace danois, Piétrain, Poland china*, sont plus prédisposées à ces effets des stress que d'autres. Or il semble, sur un plan général, que la sensibilité des porcs aux stress, corresponde : à la production de porcs bien pourvus en viande

et moins gras (Henry, 1963) ou à la recherche de l'amélioration génétique de la conformation et du coefficient de conversion des aliments en kilogrammes de poids corporel (Vold *et al.*, 1965) ou de l'amélioration du gain de poids moyen quotidien (Schmid, 1968) ou d'un meilleur rendement en viande des carcasses (Schön, 1969). A signaler que ce dernier auteur a mis en évidence au cours d'une étude portant sur 1098 demi-carcasses, une glycogénolyse lente dans les muscles des carcasses fournissant le moins bon rendement en viande et inversement. Or la tendreté de la viande est en corrélation avec l'intensité : de la glycogénolyse, de la déphosphorylation de l'ATP (adénosine-triphosphate) et de l'ADP (adénosine diphosphate) et les conditions d'apparition de la *rigor mortis*. Ainsi, chez le poulet, la viande est dure lorsque la glycogénolyse survient immédiatement avant l'abattage, ou durant celui-ci, ou durant la saignée qui suit. Inversement Fremery (1963) a montré que le ralentissement de la glycogénolyse provoqué par des injections d'adrénaline donnait une viande plus tendre, de même que la cuisson des poulets aussitôt après le sacrifice, c'est-à-dire avant que ne survienne la rigidité cadavérique. Ces études ont été reprises par Khan (1971 *a*) qui a enregistré, immédiatement après abattage, des pH allant de 6,1 à 7,0 dans la *Pectoralis major*. Or la tendreté du muscle était considérablement diminuée lorsque : *a*) sa température était supérieure à 25°C durant la chute de pH de 6,2-6,3 à environ 5,9 (pH ultime) ; le maximum de dureté étant observé pour une température de 37°C ; *b*) le contenu en ATP tombait en dessous de 40 p. 100 de la concentration initiale. Poussant plus loin ses recherches Khan (1971 *b*) a étudié les effets, sur la tendreté du *Pectoralis major*, de trois sortes de traitements inhibant les voies possibles de resynthèse de l'ATP dans le muscle *post mortem* : injection d'adrénaline 16 h avant l'abattage des poulets, injection dans le muscle excisé d'iodoacétate ou de dinitrofluorobenzène. Les poulets étaient conditionnés de telle manière que le pH musculaire aussitôt après l'abattage soit élevé (6,7-7,0). Dans ces conditions expérimentales Khan a observé que seule l'injection d'adrénaline rendait la viande légèrement plus tendre. Or, ceci n'était pas imputable à la réduction du taux d'acide lactique musculaire sous l'effet de l'adrénaline puisque l'iodoacétate qui réduisait également ce taux rendait la viande dure. Quant au traitement par le dinitrofluorobenzène il provoquait, comme l'iodoacétate, une accélération de la déphosphorylation de l'ATP et rendait, comme ce dernier, la viande dure. En conclusion, les processus de glycogénolyse *post mortem*, de déphosphorylation de l'ATP et d'apparition de la rigidité cadavérique, jouent un rôle considérable sur la tendreté de la viande. Or, ces expériences ont bien souligné le rôle de l'adrénaline que l'on sait être un médiateur du système nerveux végétatif. Il en est un autre qui joue également un rôle très important dans la physiologie musculaire : l'acétylcholine. Wilson (1968) rapporte que chez les poulets présentant héréditairement de la dystrophie musculaire : *a*) l'activité de l'acétylcholinestréase des muscles à fibres blanches prédominantes est de 30 à 40 fois plus élevée que celle des muscles à fibres rouges prédominantes des poulets témoins ou myopathiques, *b*) les *iso*-enzymes de la déshydrogénase lactique sont du type de celles que l'on rencontre dans les muscles embryonnaires. De plus la persistance de ces *iso*-enzymes de type embryonnaire se prolonge durant toute la durée de vie des animaux dans la musculature des poulets dystrophiques.

Chez les porcs il a été observé, de même, (Addis *et al.*, 1970) une haute activité de la déshydrogénase lactique — particulièrement de type *iso*-enzyme musculaire — dans la viande issue de porcs à muscles blancs, d'où l'accumulation rapide d'acide

lactique dans cette viande après l'abattage des animaux. Cette constatation rejoint les études du regretté CHARPENTIER et de GOUTEFONGEA (1969) qui ont constaté, dans les muscles blancs de porcs, la grande activité d'*iso*-enzymes provoquant la conversion du pyruvate en lactate. Pour ces auteurs cette situation peut créer une dette d'oxygène dans un muscle blanc, donc que l'on suppose être le siège d'un métabolisme anaérobie dominant. Tel n'est cependant pas le point de vue de COOPER *et al.* (1969) qui ont effectué des études histochimiques sur des muscles de porcs normaux et de porcs « stress susceptible » (dont, parmi ces derniers, figuraient 8 porcs qui, sur un lot de 20 animaux, succombèrent durant le transport à l'abattoir). Ces auteurs concluent que les fibres soudanophiles sont paradoxalement, abondante chez les porcs « stress susceptible », mais que ces fibres sont de type « intermédiaire » sur le plan métabolique, en ce sens qu'elles présentent des activités amylophosphorylase et ATP-ase élevées, alors que ces activités sont normalement basses dans les fibres rouges typiques des porcs normaux. On s'explique alors que l'anoxie musculaire consécutive aux stress engendre une accumulation d'acide lactique dans des fibres équipées pour fonctionner en aérobiose et non en anaérobiose. Or le déséquilibre hormonal : 17-OH-corticostéroïdes/aldostèrone (auquel nous faisions allusion ci-dessus) aggrave cet état physiologique. En effet PASSEBACH *et al.* (1968, 1969 *a*, 1969 *b*, 1970) ont confirmé cette hypothèse de M. HENRY (1958) en démontrant que l'injection d'aldostérone aggravait l'état PSE de la musculature, alors que l'administration de substances anti-aldostérone (de même que de dérivés cortisoniques, comme cela a été démontré par ailleurs) minimisait l'état PSE. Or VAGUE (1969) rapporte que l'administration à l'homme de 30 mg/jour de cortisol réduit sa musculature et accroît ses réserves adipeuses et PLAS et COUSTEAU (1968) que l'hypersécrétion cortico surrénalienne d'effort chez les sportifs, ne se produit pas chez les sujets surmenés, de même, la lactacidémie de base est moindre chez l'athlète en parfaite condition physique que chez l'athlète surentraîné. En conclusion, cet ensemble d'observations permet de comprendre que l'amélioration « contre-nature » des performances zootechniques (notamment sélection de porcs donnant un pourcentage élevé de viande maigre et moins de lard avec le meilleur indice de consommation possible) aboutit à des déséquilibres neuro-endocriniens responsables d'une susceptibilité anormale aux stress et de l'état PSE de la musculature qui en découle.

CONDITIONS DANS LESQUELLES SURVIENT LA *RIGOR MORTIS* ET TENDRETÉ DES VIANDES. COMPLEXITÉ DES ASPECTS ENZYMATIQUES DU PROBLÈME

Une fois l'animal abattu une séquence de transformations biochimiques — dépendantes, ou non, de facteurs technologiques — vont contribuer, d'une façon positive ou négative, à rendre des muscles donnés (ou portions d'un même muscle) plus ou moins tendres. Ces transformations peuvent être classées dans le contexte des quatre grandes étapes que la carcasse traverse, c'est-à-dire, chronologiquement : l'étape de la *pre rigor* ; celle de la *rigor mortis* ; celle de la *post rigor*, enfin celle de la « maturation » proprement dite, lorsque celle-ci se prolonge durant des jours — voire même

des semaines. Or, ainsi que MARSH (1971) le rappelait encore dernièrement, l'étape initiale de la *pre rigor* peut avoir des répercussions considérables sur les qualités organoleptiques de la viande. Le « cold shortening », notamment, survenant seulement durant cette première étape chez les bovins et ovins. De fait, un muscle donné cuit aussitôt après l'abattage est à la fois tendre et plus savoureux qu'il ne le sera jamais par la suite et, à l'opposé, il traverse sa phase de plus grande dureté durant la période de rigidité cadavérique. Une bonne connaissance des réactions enzymatiques survenant entre l'abattage et la *rigor mortis* est donc essentielle pour dégager les quelques-unes d'entre elles suceptibles de modifier si profondément les qualités organoleptiques de la viande.

A. — *Cinétique de la chute du pH dans les muscles en relation avec la glycogénolyse anaérobie*

La relation entre l'évolution du pH musculaire *post mortem* et les qualités organoleptiques des viandes, ont fait l'objet de nombreuses études notamment dans les muscles des porcins, car l'évolution du pH y est beaucoup plus variable que dans les muscles des bovins et ovins.

On a toujours attaché plus d'importance au pH_I (mesuré 45 mn après l'abattage) qu'au pH_u ou pH_{24} (pH ultime ou pH mesuré 24 h après l'abattage). Cependant NORDIN *et al.* (1971) ont mesuré le pH_I sur 1 290 porcs et sélectionné 120 d'entre eux dont les pH variaient de 5,3 à 6,9 pour l'étude du pH_u, des caractères organoleptiques, etc. Ils ont ainsi établi qu'il existait un coefficient de corrélation de 0,466 entre pH_I et pH_u et souligné que les tests d'acceptabilité par un jury de dégustateurs indiquaient une préférence pour la texture des rôtis avec les plus hauts pH (pH_I ou pH_u) et que la tendreté (Warner-Bratzler Shear Force) était en corrélation ($P < 0,05$) avec le pH_u.

B. — *Relation entre l'intensité de la glycogénolyse et la déphosphorylation de l'ATP*

CHARPENTIER (1968) a étudié les métabolites intermédiaires de la glycogénolyse chez le porc grâce à l'incubation de broyats aqueux de muscles à 30°C sous azote durant un temps (depuis la saignée de l'animal) allant de 5 mn à 240 mn. Les pH mesurés après 40 mn d'incubation permettaient de classer les porcs en deux groupes suivant l'intensité de la glycogénolyse. Le groupe « L » (à glycogénolyse lente) — comprenant 14 porcs de race *Large White* et 4 porcs de race *Piétrain* — avait des pH de $6,20 \pm 0,08$ et le groupe « R » (à glycogénolyse rapide) — comprenant 16 *Piétrain* et 6 *Large White* — avait des pH de $5,55 \pm 0,12$. Il a été constaté que les muscles du groupe « L » se caractérisaient par une nette tendance à la persistance du taux initial d'ATP durant la première heure d'incubation, tandis que dans les muscles du groupe « R » l'ATP disparaissait rapidement (voire même totalement après 3 h d'incubation). A noter aussi que 5 mn après la saignée le taux de PC (phosphocréatine) était beaucoup plus élevé dans les muscles du groupe « L » que dans ceux du groupe « R ». A l'opposé les taux d'acide lactique et de phosphore inorganique étaient plus bas dans les muscles du groupe « L » que dans ceux du groupe « R ». SCHMIDT *et al.* (1970 *a*) ont confirmé ces résultats à la suite d'une étude effectuée sur des porcs

« stress-suceptible » de race *Poland China* et « stress-resistant » de race *Chester White*, en constatant que les muscles des porcs *Poland China* présentaient 5 mn après la saignée et d'une façon hautement significative ($P < 0{,}01$) moins d'ATP et plus d'acide lactique, ce qui témoigne une glycogénolyse accélérée dans la musculature de ces animaux.

C. — *Relation entre la glycogénolyse et la déphosphorylation de l'ADP en AMP* (adénosine monophosphate) *et de l'AMP en IMP* (inosine monophosphate)

Pour Scopes (1971) les plus importants changements qui aboutissent à la transformation du « muscle vivant » en « viande morte » sont associés avec le métabolisme énergétique anaérobie : conversion du glycogène en acide lactique d'où chute du pH musculaire) et déphosphorylation concomitante de l'ATP. En effet la glycogénolyse, qui exige l'ADP comme substrat, ne peut survenir qu'aussi longtemps que l'ADP est produit à partir d'ATP par les ATP-ases musculaires. Immédiatement après la mort l'ADP est rephosphorylé en ATP par la PC et ce n'est que lorsque le taux de ce composé tend vers zéro que la glycogénolyse, à son tour, rephosphoryle l'ADP. Cependant, à aucun moment, le taux d'ADP ne serait le facteur limitant de la glycogénolyse. Celle-ci s'arrêterait, par contre, lorsque tout l'AMP a été converti en IMP (dont le taux tissulaire reflèterait l'activité de l'AMP-désaminase). Ce serait donc finalement, d'après Scopes, le degré d'activité de l'AMP-désaminase qui conditionnerait le pH_u. Scopes passe ensuite en revue les différentes activités ATP-asiques pouvant se manifester dans les muscles *post mortem* : ATP-ase des myofibrilles (dont l'activité dépend de la concentration en ions Ca^{++} libres) ; ATP-ase des mitochondries ; ATP-ase du réticulum sarcoplasmique ; ATP-ase des membranes et ATP-ases solubles dans l'eau. A propos de ces dernières, il souligne que nulle activité enzymatique n'est rigoureusement spécifique et que différentes kinases ont montré des traces d'activité ATP-asique *post mortem*. Il est ainsi possible que 20 p. 100 de l'activité ATP-asique soient le fait de kinases : créatine-kinase, myokinase, pyrurate-kinase, etc.

D. — *Relations entre la glycogénolyse, l'activité des ATP-ases et le pouvoir séquestrant du muscle vis-à-vis des ions calcium*

Heffron (1971) rappelle que pour expliquer le contrôle de la glycogénolyse musculaire *post mortem*, on a mis successivement en avant les taux tissulaires en ATP, ADP, AMP, G6P (glucose-6-phosphate), phosphates inorganiques, ions calcium et activités ATP-asiques. En ce qui concerne ces dernières, dans sa propre étude sur les ATP-ases activées par les ions Mg^{++}, l'auteur constate que l'ATP-ase des microsomes et celle des mitochondries, sont plus actives dans les muscles rouges que dans les muscles blancs. Inversement l'ATP-ase myofibrillaire est plus active dans les muscles blancs que dans les muscles rouges. Or l'ATP-ase myofibrillaire est activée par les ions calcium... d'où la théorie suivante qui a été défendue avec force : les muscles à glycogénolyse accélérée auraient moins d'aptitude à séquestrer les ions calcium dans le réticulum sarcoplasmique (par abréviation : RS) que les muscles

à glycogénolyse lente. Il en résulterait une libération accrue de ces ions, provoquant à leur tour une accélération de l'ATP-ase myofibrillaire et le déclenchement prématuré du processus de la rigidité cadavérique. Cependant, ainsi que nous allons le voir rapidement, cette théorie n'est pas entièrement satisfaisante.

Données physiologiques.

Les fibres glycérinées ou les myofibrilles peuvent se contracter et se relaxer en fonction de la concentration en ions calcium du milieu et Ashley (1971) résume ainsi ce qui se passe dans le muscle vivant : les vésicules du RS longitudinal peuvent accumuler les ions calcium en présence d'ATP. Ces vésicules, forment avec les tubules T (riches en ions sodium) du système transverse, les « triades » rencontrées notamment au niveau des stries Z. Les systèmes RS longitudinal et transverse jouent un rôle capital dans la propagation de l'onde de dépolarisation depuis la plaque motrice jusqu'aux myofibrilles. En effet l'excitation du muscle libère les ions calcium des vésicules du RS dans le sarcoplasme et il en résulte une activation des protéines contractiles (situées à quelques microns de la réserve d'ions calcium). Or l'activité de l'ATP-ase myofibrillaire est dirigée avec précision par de petites quantités d'ions calcium. La molécule de myosine (qui possède une affinité mesurable pour les ions calcium) semble être le siège électif de leur action. Cependant une molécule intermédiaire : la troponine, retient ces ions calcium. Le mécanisme grâce auquel cette protéine globulaire contrôle l'interdigitation des filaments d'actine et de myosine est encore mal connu. Il semble être toutefois en rapport avec une autre protéine : la tropomyosine, isolée du muscle par Ebashi en 1963. La concentration sarcoplasmique des ions calcium nécessaire à l'activation de l'ATP-ase myofibrilaire est comprise entre 10^{-6} et $0{,}3 \cdot 10^{-7}$ M. La troponine peut lier jusqu'à $0{,}7 \cdot 10^{-4}$ M/kg, mais la concentration en ions calcium du sarcoplasme ne dépasse jamais 1 à $2 \cdot 10^{-6}$ M. (Rappelons que la concentration en ions magnésium est environ 10 000 fois plus grande.)

Application aux viandes.

Ces données physiologiques ont été à l'origine de nombreux travaux de recherches appliqués aux viandes : Krzywicki (1971) a étudié la séquestion des ions calcium et l'activité de l'ATP-ase myofibrillaire dans le muscle *Longissiumus dorsi* de porc en relation avec le pH_1 (mesuré 35 mn après l'abattage). Ces pH_1 variaient de 5,3 à 7,0. Or, pour toutes les valeurs supérieures à 5,9. l'auteur a observé que la séquestration des ions Ca^{++} et l'activité ATP-asique étaient toutes deux négativement et significativement en corrélation avec le pH_1 (en dessous de pH 5,9 ils supposent que le RS et l'ATP-ase sont endommagés par l'excès d'acide lactique). Greaser *et al.* (1969) après avoir constaté que la capacité de fragments du RS à séquestrer les ions Ca^{++} déclinait de 5 à 20 fois durant les 24 premières heures *post mortem* et que la diminution de ce pouvoir séquestrant était d'autant plus forte que les pH_1 étaient plus bas (résultats en opposition avec ceux de Krzywicki) se sont attachés à l'étude des conditions de maintien de l'intégrité du RS *post mortem*. Ils constatent l'existence d'une « conjonction pH-température » vis-à-vis de l'intégrité du RS. En effet, à pH 7,2 et 37°C ou pH 5,6 et 0°C, le pouvoir séquestrant des ions Ca^{++} est conservé durant 24 h alors qu'il est aboli en 1 h à pH 5,6 et 37°C. A noter qu'au cours de cette

étude il n'a pas été observé de différences dans les activités de l'ATP-ase activée par les ions Ca^{++}, tandis que de leur côté Schmidt *et al.* (1970 *a*) n'ont pas observé de différences dans les possibilités de captation des ions Ca^{++} par le RS. Enfin, Van Hoof *et al.* (1971) constatent sur des broyats de bœuf, salés à 1 p. 100, que la séquestration des ions Ca^{++} et Mg^{++} au moyen de fortes doses de diphosphate n'inhibe pas, mais au contraire accélère, la déphosphorylation de l'ATP et ils concluent que cette constatation ruine l'hypothèse que l'hydrolyse de l'ATP est essentiellement le fait de l'ATP-ase myofibrillaire. Ce travail peut d'ailleurs être rapproché de celui de Newbold et Scopes (1971) qui constatent que l'addition de phosphates de potassium (pH 6,7) accélère l'activité ATP-asique et insistent sur le fait que la déphosphorylation de l'ATP n'est pas le reflet de l'activité ATP-asique mais celui de l'activité de l'AMP-désaminase.

Devant ces résultats contradictoires on est amené à se demander si l'état neuro-végétatif de l'animal vivant considéré dans son contexte endocrinien, n'est pas le facteur essentiel de la régulation des activités ATP-asiques, de la glycogénolyse et de la plus ou moins bonne séquestration des ions calcium, *post mortem*. Voici quelques arguments en faveur de cette hypothèse : on sait que l'acétylcholine libère le calcium musculaire faiblement fixé et que la prostaglandine EI libère de ses complexes le calcium fortement lié ; il a été démontré (Mc Louglin, 1970) que la stimulation *in vivo* (sous anesthésie et assistance respiratoire) d'un nerf moteur chez le porc, accélérait la chute du pH musculaire *post mortem* et, qu'inversement, l'injection de curare (qui prévient les contractions musculaires) retardait cette chute de pH. Cette expérience justifie l'utilisation de dépolarisants-myorelaxants avant l'abattage (Krylova *et al.*, 1971 *b*) ou de divers sédatifs méprobamate, butyrophénones, etc. On a également constaté que l'injection de sulfate de magnésium à des porcs « stress-susceptible » avant abattage, ralentissait la vitesse de la glycogénolyse musculaire *post mortem*, d'où : moins d'acide lactique dans les muscles et davantage d'ATP et de PC (Schmidt *et al.*, 1970 *b* ; Lister *et al.*, 1970). Il est intéressant de souligner à ce propos que la *rigor mortis* des porcs « stress-susceptible » traités par le sulfate de magnésium survenait plus rapidement que chez les porcs « stress-résistant » *à égalité de taux d'acide lactique et de PC musculaires*. Au cours d'autres expériences, mais cette fois de perfusion chez des porcs vivants anesthésiés, de chlorure de calcium ou de chlorure de magnésium, il a été démontré (Campion *et al.*, 1971) que les ions magnésium ralentissaient la chute du pH musculaire *post mortem* en même temps que l'apparition de la *rigor mortis* et qu'au contraire, la perfusion d'ions calcium accélérait cette chute de pH sans modifier cependant le cours de la rigidité cadavérique.

Les auteurs de ces expériences de perfusion concluaient qu'une glycogénolyse musculaire accélérée pourrait être en relation avec un appauvrissement des muscles en magnésium ionisé. Ces déductions sont en accord avec les résultats de Krzywick (1971) qui ont mis en évidence, *in vitro*, un ralentissement de l'activité ATP-asique-Ca^{++} sensible, en présence d'ions Mg^{++}, ledit ralentissement pouvant résulter soit d'une réduction de la migration transmembranaire des ions Ca^{++}, soit d'un blocage partiel des jonctions neuro-musculaires.

Les ions K^+ et Na^+ sont également imbriqués dans l'excitabilité neuro-musculaire. En particulier la déperdition d'ions K^+ par les muscles (et leur enrichissement concomitant en ions Na^+) peut être un facteur d'accélération de la glycogénolyse *post mortem*. On reproduit expérimentalement ce double échange ionique

en soumettant les porcs à des températures élevées, 37°C par exemple, (Theoharova, 1970). Le contexte endocrinien de ce stress thermique a été étudié chez l'Homme travaillant en ambiance chaude. (Kolanovwski *et al.*, 1971). Il consiste essentiellement en une hypersécrétion d'aldostérone analogue à celle que nous avons observé (Henry, 1958, 1961) chez le porc subissant le stress de la cage à métabolisme. L'association de ces deux types de stress (cage à métabolisme placée dans une enceinte à 45°C) a été préconisée par Charpentier (1970) en tant que test prévisionnel d'appréciation de l'état PSE. L'épreuve dure 15 minutes, pendant lesquelles on enregistre la température du muscle *L. dorsi*. Dans le cas des porcs « stress resistant » elle demeure pratiquement à son niveau initial (38,3 à 39,5°C). Par contre, dans le cas des porcs « stress susceptible » donnant de la viande PSE, la température initiale est à la fois plus élevée et en progression nette durant l'épreuve puisqu'elle atteint environ 42,5°C. (A noter que lorsqu'elle atteint 44°C ou plus, les animaux meurent) Cette élévation thermique musculaire est le témoin d'une intense déphosphorylation de l'ATP chez les porcs présentant l'état PSE. Bickhardt (1969) a d'ailleurs mis à profit l'hyperactivité enzymatique du sérum sanguin pour le diagnostic de la dégénérescence musculaire des porcs carencés en vitamine E et sélénium. (Il y a, notamment, une activité anormalement élevée de la créatine-kinase.)

CONDITIONS DE REFROIDISSEMENT DES VIANDES ET TENDRETÉ (« COLD SHORTENING ») ASPECTS ENZYMATIQUES DE LA RÉSOLUTION DE LA RIGIDITÉ CADAVÉRIQUE ET DE LA MATURATION

Le rôle exclusif qu'on voulait faire jouer au tissu conjonctif dans la tendreté de la viande a prévalu pendant très longtemps. Cependant depuis que Locker, en 1960, a rapporté que la tendreté du bœuf était influencée par le degré de la contraction musculaire *post mortem*, on s'est attaché à faire de la mesure des sarcomères un critère de tendreté (Voyle, 1971), notamment pour les muscles pauvres en tissu conjonctif, *L. dorsi*, par exemple. L'observation (déjà rapportée) de Buchter *et al.* (1971) à savoir que c'est le sexe des bovins qui influence surtout la tendreté du *L. dorsi*, alors que c'est l'âge qui influence le plus celle des muscles riches en conjonctif, tel le *Semitendinosus*, trouve ainsi son interprétation ; de même qu'une autre observation (rapportée également) de Krylova *et al.* (1971) qui constatent que la tendreté du *Semitendinosus* est surtout en corrélation avec son contenu en collagène soluble alors que celle du *L. dorsi* est en corrélation non seulement avec le contenu en collagène soluble mais aussi avec la quantité d'eau résiduelle dans la viande cuite et la perte de jus durant la cuisson.

On peut donc considérer, sur un plan général, que la contracture *post mortem* diminue la tendreté. Inversement, on améliore la tendreté lorsqu'on met en œuvre des moyens (physiologiques, physiques et mécaniques) susceptibles de s'opposer au raccourcissement des muscles *post mortem*. A signaler, à ce propos, que le diamètre des fibres musculaires (reflet dans une certaine mesure du « grain » de la viande) que l'on sait s'accroître avec le développement de l'animal de la naissance à l'abatage, s'accroît également avec le raccourcissement des sarcomères. Ainsi Moller

(1970) a-t-il trouvé une corrélation hautement significative entre le diamètre des fibres et la longueur des sarcomères *post mortem*. Des facteurs très variés affectent la longueur des sarcomères : façon dont se déroule la *rigor mortis*, contraction ou étirement des muscles suivant leur position anatomique et la posture de la carcasse entre l'abattage et la *rigor mortis* ; action du froid sur la viande après l'abattage (« cold shortening ») ; action de la décongélation (« thaw shortening ») etc.

A. — *Raccourcissement de la viande au froid et répercussion sur la tendreté*

Les travaux de ces dernières années ont confirmé l'observation princeps faite en 1966 par MARSH et LEET à savoir que le raccourcissement musculaire durant l'étape conduisant à la *rigor mortis*, diminue considérablement la tendreté de la viande. C'est ce qui se passe de façon spectaculaire après refroidissement rapide d'un muscle détaché de ses insertions osseuses aussitôt après l'abattage. A titre indicatif, pour illustrer cette notion de « cold shortening » en corrélation avec la tendreté, disons qu'un muscle initialement tendre le sera encore légèrement s'il se raccourcit de 20 p. 100 et qu'il sera très dur pour un raccourcissement de 40 p. 100. (A l'opposé si le raccourcissement atteint 60 p. 100, la destruction des sarcomères le rendra moins dur.) Bien entendu plus la carcasse est volumineuse moins le refroidissement de la musculature est rapide, c'est pourquoi le « cold shortening » affecte surtout les petites carcasses lorsqu'on les refroidit sans aucun ménagement et plus particulièrement les carcasses d'agneaux. Une étude très documentée a été faite sur ce sujet par LACOURT et le regretté CHARPENTIER (1971). Ces auteurs ont expérimenté sur 5 muscles de carcasses d'agneaux de 9 mois d'un poids moyen de 17 kg et déterminé le type métabolique et le type de contraction des différents groupes de fibres musculaires composant ces muscles. Le type métabolique (type fibre rouge à acidification lente ou type fibre blanche à acidification rapide) a été déterminé par coloration histochimique de la succino-déshydrogénase mitochondriale, dont un taux élevé est le témoin d'un métabolisme énergétique aérobie, en corrélation d'ailleurs avec le taux de myoglobine. Quant au type de contraction (lent ou rapide) il a été déterminé par pré-incubation des coupes histologiques en milieu acide (pH 4,4) ou alcalin (pH 10,2). On sait en effet que l'ATP-ase myofibrillaire des muscles à contraction rapide est la seule à être activée par une faible concentration d'ions Mg^{++} en milieu alcalin. Il a été ainsi possible, pour les 5 muscles étudiés, de déterminer d'une part les pourcentages respectifs de fibres rouges et blanches (celui des fibres intermédiaires variant peu d'un muscle à l'autre) et d'autre part le type : lent ou rapide, des fibres rouges (les fibres blanches sont toutes du type rapide et les fibres intermédiaires sont le plus souvent du type lent). La conclusion des auteurs est que ce sont les fibres rouges rapides, dont les muscles du mouton sont bien pourvus, qui subissent le plus intensivement un raccourcissement au froid. En effet ces fibres réunissent les deux conditions nécessaires au « cold shortening », *1re condition* : pH supérieur à 5,9 ; *2e condition* : ATP-ase active en dessous de 10°C. En conclusion, tous les muscles semblent être capables de se contracter en dessous de 10°C lorsque le pH est supérieur à 5,9 et la teneur en ATP réduite et ceci se traduit par une diminution notable de la tendreté de la viande. On s'explique ainsi que les muscles qui s'acidifient rapidement, tel le *L. dorsi*, soient peu affectés par le « cold shortening ».

B. — *Mécanisme biochimique du « cold shortening »*

Les ions calcium jouent un rôle clef dans la contraction musculaire et dans la rétraction ultime des sarcomères lors de la *rigor mortis*. Weiner et Pearson (1969) en apportent la preuve en injectant avant l'abattage des chélateurs de ces ions ce qui a pour effet de réduire, *post mortem*, la vitesse de la glycogénolyse et celle de la déphosphorylation de l'ATP. Or les auteurs ont établi, chez le porc, la relation : ATP-raccourcissement des fibres-tendreté, ainsi qu'une corrélation négative entre la perte de cuisson, le pH mesuré 10 minutes après l'abattage ou le taux d'ATP à ce moment. Cependant ces chélateurs perfusés *post mortem* ne donnent aucun résultat. Par ailleurs, si le réticulum sarcoplasmique est considéré être capable de contrôler la concentration en ions calcium du sarcoplasme, il ne faut pas oublier que la troponine peut aussi lier ces ions « au passage » pourrait-on dire (voir § III, *d*), ci-dessus), c'est ainsi que le degré d'interaction : F-actine-tropomyosine-troponine a pu être mis en cause dans le processus d'activation de l'ATP-ase myofibrillaire *post mortem*. (Fukazawa, 1970 et Arakawa, 1970). De son côté, Marsh (1971), pour frapper l'imagination des chercheurs des Instituts des Viandes réunis à Bristol en septembre 1971, leur suggère une expérience instructive. Elle consiste à prélever dans l'encolure d'un bœuf qu'on vient d'abattre un muscle qui a la réputation de donner une viande dure : le *sternomandibularis* et de diviser ce muscle en trois parties. La première est plongée aussitôt dans l'eau bouillante pour subir une cuisson de 50 mn. La seconde est conservée à 15-20°C durant 24 h, puis placée dans un réfrigérateur à 0-5°C durant 24 h avant d'être cuite dans les mêmes conditions que précédemment. Quant au 3e morceau il est placé, 3 à 4 h *post mortem*, dans un réfrigérateur à 0-5°C durant 48 h. A ce moment il subit la même cuisson que les deux morceaux précédents. Après cuisson et refroidissement, on effectue sur chacun des morceaux des mesures de tendreté comparables entre elles. On peut alors constater que le second morceau (pour lequel la *rigor mortis* était complète après 24 h à 14-20°C) présente des chiffres de dureté 2 à 3 fois supérieurs à ceux du premier morceau cuit lorsque la viande était encore « pantelante ». Quant au 3e échantillon, dont les fibres musculaires ont été raccourcies durant la rigidité cadavérique survenue à basse température (0-5°C), il présente des chiffres de dureté 2 à 3 fois supérieurs à ceux du second, soit 8 fois plus grand que ceux obtenus pour le premier échantillon cuit avant la *rigor mortis*. La question que pose Marsh à propos de cette expérience est la suivante : dans les 3 cas le raccourcissement musculaire après cuisson était important (30 à 40 p. 100, voire même 50 p. 100 de la longueur initiale), pourquoi alors, le raccourcissement du simple fait de la cuisson donne-t-il une viande moins dure que le raccourcissement obtenu par la combinaison : *rigor*-cuisson ? Enfin le second échantillon, mis en chambre froide après le déroulement de la rigidité cadavérique à 15-20°C, était moins dur que le troisième placé à 0-5°C alors que la viande était encore « pantelante ». En conclusion, le raccourcissement musculaire du fait de la rigidité (surtout si celle-ci survient au froid) a, au moins chez le bœuf et l'agneau, des effets néfastes sur la tendreté de la viande cuite, alors que le même raccourcissement du simple fait de la cuisson, en a moins. Ce dernier aspect, qui concerne la liaison de l'eau dans la viande, est sans doute en rapport avec l'influence des ions calcium et du pH tel que Frouin (1971) l'a étudié et le resserrement du réseau formé par les chaînes

protéiques sous l'influence des ions calcium et magnésium, tel que GOUTEFONGEA (1969) l'a imaginé à la suite d'une étude portant sur le pouvoir de rétention de l'eau en fonction de la fraction de calcium et de magnésium liés aux protéines (exprimée en p. 100 de la concentration totale de ces ions). Signalons, à ce propos, l'étude de Mc CLAIN *et al.* (1969) qui rappellent que, dès 1959, SWIFT et BERMAN avaient constaté que le contenu en calcium, magnésium et potassium des viandes affectait négativement leur capacité de rétention de l'eau et que le contenu minéral s'accroissait avec le contenu en protéines et que, par opposition, le contenu en fer et zinc variait en raison inverse du contenu en protéines (il était donc en relation positive avec la capacité de rétention de l'eau).

En conclusion, la conception actuelle du rôle des ions musculaires, notamment des ions calcium, dans le raccourcissement musculaire *post mortem* et de l'influence de ces ions sur la rétention de l'eau dans les viandes et leur tendreté, est sans doute par trop univoque.

C. — *Comment éviter le « cold shortening »?*

MARSH (1971) évoque avec nostalgie les qualités savoureuses de la viande consommée une heure après l'abattage, comme cela arrive encore en Afrique et en Asie et il pose cette question importante : tendreté et qualité bactériologique sont-elles vraiment deux données incompatibles?

L'application du froid à la conservation de la viande, qui débuta aux U. S. A. vers 1880, s'est petit à petit généralisée, très souvent dans un souci d'hygiène alimentaire, mais c'est loin d'être une panacée, notamment si l'on considère le plan technologique ou les qualités organoleptiques. KUCHLING *et al.* (1970) à propos d'une étude sur le refroidissement des viandes PSE de porc, disent textuellement : « Il résulte de nos recherches que la mise en œuvre des méthodes de réfrigération rapides après l'abattage ne représente pas une solution à la correction de l'état PSE de la musculature et l'industrie de la viande devrait fortement influencer la sélection des porcs pour prévenir les pertes que lui occasionne une politique économique de haute productivité dans le domaine de l'élevage. » De son côté, LACOURT (1970) conseille de « refroidir les carcasses de telle façon que le pH et la température diminuent simultanément jusqu'à 22-10°C à cœur des morceaux de viande ». LACOURT et CHARPENTIER (1971) précisent qu'il serait souhaitable de faire séjourner les carcasses de bœufs et de moutons dans des salles de ressuyage régulées à 15°C durant un temps fonction de la masse à réfrigérer. SMITH *et al.* (1971) à la suite d'une vaste étude portant sur 280 steaks provenant de 56 carcasses de bœufs, conseillent de les conserver 16 h à 16°C avant de les réfrigérer à 2°C (durant 148-160 h), cependant pour PARRISH *et al.* (1969), les muscles de bovins, lorsqu'ils restent attachés à la carcasse, deviennent tendres très tôt *post mortem* et peu importe que le ressuyage des carcasses soit effectué à 7°C ou 15°C durant un jour ou deux. Quant aux méthodes consistant à s'opposer au raccourcissement musculaire par modification du mode de suspension traditionnel des carcasses (HOSTELER, 1970 ; HARRIS *et al.*, 1971), elles demeurent trop onéreuses — bien qu'ayant fait la preuve de leur efficacité — pour être appliquées industriellement.

En ce qui concerne la prédisposition au « cold shortening », on ne peut être que frappé par la remarque de LACOURT et CHARPENTIER (1971) à savoir : « La varia-

bilité dans l'intensité du raccourcissement au froid chez l'agneau est plus grande entre animaux qu'entre muscle d'un même animal » ; observation corroborée par celle de Mc Crae *et al.* (1971) relative aux inversions de tendreté des muscles d'agneau après congélation en *pre rigor* ou *post rigor*, celle-ci ayant eu lieu alors que les carcasses étaient conservées à 18°C durant des temps variables. En effet, en dehors de l'intervention d'une ATP-ase myofibrillaire de type « contraction rapide » dans le déroulement du processus *rigor*-cold shortening, on peut se demander s'il n'intervient pas, et ceci d'une façon très précoce, une ATP-ase membranaire sensible aux ions sodium et dont Boegman *et al.* (1970) ont signalé l'existence dans le muscle, car les heureux effets des substances anti-aldostérone dans l'évolution des viandes de porcs PSE (Passbach *et al.*, 1968, 1969, 1970) peuvent s'expliquer à travers l'inhibition éventuelle d'une telle ATP-ase.

D. — *Aspect enzymatique de la résolution de la rigidité cadavérique, « maturation » des viandes*

On peut résumer ainsi les étapes conduisant à la *rigor mortis* : dès la fin de la saignée, la phosphocréatine musculaire et le pH décroissent rapidement. L'ATP reste à taux à peu près constant jusqu'à déplétion totale de la phosphocréatine (état « pantelant » de la viande), puis l'ATP décroît à son tour et à partir d'un certain seuil l'extensibilité des muscles diminue rapidement ce qui conduit à la *rigor mortis*.

Résolution de la rigidité cadavérique, action protéolytique des cathepsines.

On admet, pour la viande de bœuf évoluant normalement, que l'état « pantelant » (pH 7,0-6,5) dure de une à trois heures après l'abattage, puis la *rigor mortis* s'installe progressivement en 24 h environ (le pH descend lentement à 6,0). Ensuite commence la période de résolution de la rigidité cadavérique (pH 5,8 environ) et la pleine « maturation » se situe vers le 3e jour après l'abattage (pH inchangé). On admet que le ramollissement de la viande, en fin de *rigor mortis*, est le fait des cathepsines musculaires. Rosset et Rozier (1965) ont fait une excellente revue de cette question à laquelle nous renvoyons le lecteur. Nous ne ferons donc que résumer brièvement les acquisitions scientifiques récentes : les cathepsines ont pour origine les lysosomes dont la membrane, très fragile, se lyse progressivement au cours de la maturation (15 p. 100 de cathepsine D libérés en huit jours). A noter qu'outre les cathepsines les lysosomes du muscle bovin renferment des glucosidases (Ono, 1970). Le muscle bovin renferme au moins trois cathepsines (B, C et D) dont le maximum d'activité protéolytique se situe entre pH, 3,8 et 4,8 (Lutalo, 1969). De leur côté Kopp et Valin (1971) ont étudié l'action protéolytique d'une cathepsine D purifiée, extraite de rate bovine, en la faisant agir sur des préparations de myofibrilles incubées à pH 5,0 ;.5,2 ; 5,5 et les auteurs constatent que cette protéolyse est manifeste sur des préparations de myofibrilles faites *post rigor*. Les auteurs ont également constaté, sur du collagène acido-soluble ou dénaturé-soluble extrait à 65°C durant 2 h 30 à pH 5,5, un double effet à pH 3,5 : dépolymérisation et apparition de nouveaux peptides. A noter que Ono (1971) fait état de lysosomes ayant pour origine les macrophages et le tissu connectif et que, chez le bœuf, ces espèces de lysosomes sont présents dans le muscle. Il suggère que les relations entre l'activation des cathepsines, la protéolyse et la tendreté pourraient être élucidées plus avant en utilisant la β-galactosidase.

Résolution de la rigidité cadavérique, changements dans les ultrastructures musculaires.

Contrairement à ce qu'on pensait autrefois et jusqu'à plus ample information, on admet aujourd'hui que la protéolyse cathepsique est très discrète et la formation de cristaux de L-tyrosine dans la viande après six mois d'autolyse aseptique demeure une curiosité de laboratoire. Par contre on a pu observer (JOSEPH, 1970 ; DAVEY *et al.*, 1970 ; SALE, 1971 ; REVILLE *et al.*, 1971 ; HERLIHY *et al.*, 1971) :

— un affaiblissement des liaisons entre filaments d'actine et de myosine. Or, sur la base de l'hypothèse des filaments coulissants, la capacité d'un muscle à produire une tension est proportionnelle aux nombres d'interactions entre actine et myosine et il est possible qu'un des facteurs de tendreté du muscle *Psoas* (filet) soit le petit nombre d'interactions dont il est le siège;

— une rupture des liaisons entre les filaments d'actine et les lignes Z (ces liaisons seraient le point faible de l'ultrastructure des fibres musculaires);

— une rupture des liaisons entre les filaments d'actine et la tropomyosine à l'intérieur des filaments I des sarcomères;

— une perte de matériel à partir des lignes Z. Cette perte peut provoquer un simple plissement en zigzag, ou une désintégration complète, des stries Z.

En conclusion, l'altération des myofibrilles se traduit par une disparition progressive de la striation longitudinale (témoin des alignements longitudinaux des myofibrilles) et par une disparition de la striation transversale (témoin des alignements latéraux des stries Z et I). Finalement on observe une perte totale de la cohésion des myofibrilles au sein des sarcomères.

Il survient aussi une altération du réticulum sarcoplasmique, qui a été étudiée par SCHALLER et POWRIE (1971) ainsi qu'une altération des structures lipoprotéiques en général, décrite sous le nom de « lipophanerosis » par BELOUSOV et SKALINSKY (1970) et qui peut aller jusqu'à la désintégration de ces structures.

L'ensemble de ces altérations des protéines de structure des sarcomères est-il uniquement de nature enzymatique? Ceci est peu probable car il n'y a pas de corrélation entre la concentration en composés sulfhydrilés et la *rigor mortis* ou le degré de maturation (CALDWEL *et al.*, 1969). D'ailleurs VALIN et SALE (1970) sont formels sur ce point : les changements dans les ultrastructures qu'ils ont observés au cours de la maturation de la viande ne peuvent s'expliquer uniquement sur la base d'activités protéolytiques dans le tissu musculaire. BELOUSOV *et al.* (1971) font également remarquer que les muscles de l'avant et de l'arrière des carcasses subissent des compressions avec homogénéisation des structures submicroscopiques, alors que ces structures demeurent relativement intactes au milieu des carcasses. A noter, enfin, que AUDUTSKEVITCH *et al.* (1971) ont constaté que l'autolyse à la surface des carcasses était considérablement retardée du fait du froid qui se manifeste plus précocement à ce niveau.

E. — *Conditions climatiques de la maturation*

D'après le journal : *Amstralian Refrigeration, Air Conditioning and Heating* (novembre 1969, 49-50), pour un temps de maturation donné, l'indice de tendreté double à chaque fois que la température s'élève de 10°C et la viande

peut être emballée ou non. Ces deux remarques les conduisent à distinguer 3 cas :

1er cas : pour les carcasses, demi-carcasses, quatiers, morceaux individuels, *non emballés,* on conseille : 8 jours à 6°C, ou 14 jours à 2°C, ou 16 jours à 0°C, avec une humidité relative de 85-90 p. 100 et une vitesse de l'air au voisinage des morceaux de 3 mètres/minute.

N. B. : A la suite d'une vaste expérimentation, MARTIN *et al.* (1971) estiment que pour les carcasses de bovins, 6 jours de réfrigération à 2-4°C, suffisent pour avoir une tendreté suffisante.

2e cas : lorsque des petits morceaux sont rapidement et proprement *emballés* sous vide dans des films imperméables aux gaz et rétractables à la chaleur, on conseille 14 jours de réfrigération à 2°C (voire même 21 jours pour les viandes de bovins âgés) ou encore 16 jours de réfrigération à 0°C.

N. B. la viande emballée très proprement se conserve 4 semaines et demie à 5 semaines à 2°C.

3e cas : pour des petits morceaux *emballés* sous des films perméables aux gaz, on conseille de placer les morceaux après emballage dans une enceinte à atmosphère contrôlée (25 p. 100 de gaz carbonique) durant 14 jours à 2°C.

N. B. : Dans les 3 cas ci-dessus, la réfrigération proprement dite gagne à être précédée d'un ressuyage préalable des carcasses à température relativement élevée. On conseille 20 heures à 10°C s'il s'agit de demi-carcasses de bovins et 12 heures à 7°C s'il s'agit de carcasses de moutons et d'agneaux.

Nous ne nous étendrons pas sur les procédés de maturation à température élevée, procédé TENDERAY par exemple, consistant à conserver la viande à 15°C durant trois jours pour provoquer un accroissement de tendreté comparable à celui qu'on obtient après 3 semaines de conservation à + 1°C, ou procédés similaires (CAGLE *et al.*, 1970) : conservation de la viande de porc à 25°C ou des quartiers après abattage à 49°C et 90 p. 100 d'HR jusqu'à ce que la température de la viande atteigne 43°C et maintien de cette température dans l'enceinte durant 24 h. Ces procédés impliquent en effet l'usage de substances ou rayonnements anti-bactériens, difficiles à mettre en œuvre et non légaux en France. Par ailleurs, l'intérêt économique de ces procédés d'attendrissage accélérés est douteux — compte tenu des risques encourus — comparativement au procédé classique : conservation 6 jours à 2-4 °C (la tendreté évolue très peu après 10 jours de conservation à 4°C).

Le problème le plus important, en matière de tendreté, est d'éviter le « cold shortening » pour les viandes qui y sont sensibles, en ne les réfrigérant pas en dessous de 22... 10°C (moyenne 16°C) suivant les cas, durant la période précédant la rigidité cadavérique. Se rappeler à ce propos qu'un muscle excisé de la carcasse conservé 2 jours à 16°C est plus tendre que le même muscle conservé 13 jours à 2°C (PARRISH *et al.*, 1969).

TENDRETÉ ET TISSU CONJONCTIF (OU CONNECTIF) MUSCULAIRE. INFLUENCE DES FACTEURS S'Y RATTACHANT (LIPIDES INTRA-MUSCULAIRES, AGES DES ANIMAUX ET SEXE, MODE DE CUISSON DE LA VIANDE)

Butcher (1970) résume ainsi, pour nous, les quatre premiers paragraphes de la présente note : la qualité finale de la viande de bœuf est le résultat non seulement de la sélection des animaux et de leur alimentation, mais elle est également hautement influencée par les conditions de transport des animaux sur les lieux d'abattage et les conditions de ressuyage et de maturation des carcasses ou morceaux. C'est pourquoi les stations danoises de testage de la descendenace doivent observer, pour les veaux et jeunes taureaux, des recommandations qu'il serait souhaitable d'étendre à tout le commerce de la viande. Ces recommandations concernent la prise en charge des animaux à la ferme, leur transport vers les abattoirs (en évitant les stress), le ressuyage des carcasses (24 h à 6°C), leur refroidissement ultérieur (4°C), leur découpage (pas plus tard que 2 jours *post mortem*) et maturation du muscle *L. dorsi* à 4°C durant 7 j *post mortem* pour les veaux et 9 j pour les jeunes taureaux.

A. — *Tendreté et tissu conjonctif*

Les composants du tissu conjonctif sont représentés par des colloïdes fibrillaires : collagène, élastine, réticuline et par des colloïdes amorphes (constituant la substance fondamentale) c'est-à-dire : collagène soluble, polysaccharides (ou « mucopolysaccharides »), glycoprotéines (ou « mucoprotéines ») et autres protéines. Les mucopolysaccharides acides ont des points isoélectriques souvent compris entre pH 2 et pH 3. Ainsi, aux pH physiologiques, sont-ils chargés négativement et neutralisés par des cations minéraux (sodium, potassium, calcium, magnésium) et de ce fait ils peuvent jouer un rôle important dans la tendreté de la viande.

La centaine de muscles présents dans une carcasse produisent une quarantaine de morceaux de viande qui diffèrent beaucoup entre eux au point de vue tendreté et le tissu conjonctif est certainement en cause dans bien des cas mais pas toujours. Ainsi le *semitendinosus* est dur car son tissu conjonctif renferme une forte proportion d'élastine qui ne s'hydrolyse pas à la cuisson ; le jarret de bœuf est dur parce qu'il renferme beaucoup de collagène hautement polymérisé alors que le collagène de certains morceaux de veau renfermant beaucoup de conjonctif également, est moins dur, car ce conjonctif présente moins de liaisons de covalence aux points d'entrecroisement des fibres de collagène. Beaucoup d'auteurs ont d'ailleurs constaté que les différences de tendreté entre morceaux ne sont pas toujours en bonne corrélation avec leur teneur en collagène (Field, 1969 ; Prost, 1969 ; Szeredy, 1970 *a*). Bailey (1971) rappelle que les fibres de collagènes des tendons se divisent à travers le muscle pour former un réseau continu de véritables tubes empilés les uns sur les autres. Ainsi chaque myofibrille est entourée d'un mince filet de collagène appelé endomysium ; chaque faisceau de myofibrilles est entouré d'un autre feuillet de collagène appelé perimysium et finalement le muscle entier est enchâssé dans une aponévrose conjonctive : l'épimysium. Le « grain » de la viande, que l'on considère comme étant un

facteur de tendreté lorsqu'il est « fin » apprécie empiriquement (au toucher) le diamètre moyen des fibres et faisceaux musculaires. Pour Paul *et al.* (1971), dans le muscle *spinalis dorsi* du bœuf, la minceur des feuillets d'endomysium et de perimysium et les possibilités de clivage des fibres contractiles qui en résultent, durant la cuisson, sont des facteurs de tendreté. Au contraire la dureté du muscle *trapezius* semble en relation avec la présence de grosses fibres musculaires enchâssées dans un réseau dense de collagène très entrecroisé, l'ensemble : fibres musculaires-collagène se désintégrant mal à la cuisson. Les conditions dans lesquelles la maturation avant cuisson de la viande a été réalisée peuvent affecter cette désintégration et pourtant on admet (Sale et Valin, 1970 ; Mc Clain *et al.*, 1970) que le tissu conjonctif ne subit pratiquement aucun changement en maturation ? En effet, même si l'existence dans les lysosomes de « cathepsines collagénolytiques » et de peptidases semble démontré (Laakkoven *et al.*, 1969 *a*, 1969 *b*, 1970 *a*, 1970 *b*, 1970 *c* et Etherington, 1971) le pH habituel de la viande (5,5 à 5,9) est à la limite extrême de leur activité (optimum pH 4,5) et la température de maturation (0 à 4°C) n'est pas non plus favorable. C'est pourquoi Etherington met l'accent sur l'intérêt que peut présenter l'addition de protéinases collagénolytiques à la viande. Il pense qu'outre les préparations enzymatiques actuelles qui agissent sur le tissu conjonctif durant la cuisson, il serait intéressant de découvrir une enzyme thermolabile susceptible de dégrader le conjonctif durant l'étape de la maturation. Cette protéinase ne devrait pas être une collagénase « vraie » celle-ci dégradant par trop le réseau de conjonctif, mais une enzyme dont l'action serait localisée à la région télopeptidique. Pour Mc Intosh (1961 ; 1965 ; 1966) tous les mucopolysaccharides musculaires sont virtuellement liés à des protéines et les mucoprotéines qui en résultent sont étroitement associées aux structures fibreuses du tissu conjonctif et plus particulièrement avec l'élastine puisque le contenu en hexosamine varie parallèlement avec le taux d'élastine. La tendreté pourrait donc être influencée autant par les mucoprotéines que par les structures fibreuses du conjonctif elles-mêmes. (Les mucoprotéines sont hydrolysées par la hyaluronidase testiculaire, la papaïne, le lysosyme, etc.). Mc Clain et Pearson (1969 *b*) trouvent dans l'épimysium musculaire une densité de liaisons covalentes de 5,23 par molécule de tropocollagène dans le *longissimus dormi* des porcs PSE, contre 7,73 dans le *L. dorsi* des porcs normaux et ceci expliquerait la perte importante de substance fondamentale conjonctive dans les muscles PSE. De leur côté : Wipf, Mullins et Passebach (1970) trouvent que dans les muscles de porcs PSE, il y a plus de chondroïtine-sulfate et surtout de dermatane-sulfate et moins d'héparine que dans les muscles de porcs résistant aux stress. Ils constatent une corrélation positive ($P < 0,01$) entre la force de cisaillement (Warner-Bratzler) et la concentration en dermatane-sulfate. Enfin d'après Cormier (1971) le dermatane-sulfate est le principal mucopolysaccharide acide (par abréviation MPSA) du tissu conjonctif du veau, de la génisse et de la vache (il est aussi présent chez le bœuf) et le taux d'hexosamine du collagène insoluble de l'epimysium est positivement associé avec la dureté de la viande.

B. — *Tissu conjonctif, âge et sexe des animaux*

Cormier *et al.* (1971) rappellent que les œstrogènes, qui ont pour origine les ovaires et le placenta, accroissent le taux de polysaccharides du tissu conjonctif et plus particulièrement celui de l'acide hyaluronique. Or, le taux d'acide hyaluronique

tend à décroître avec l'âge, d'où l'intérêt des implants d'œstrogènes chez les bovins, ovins, volailles, etc. qui provoquent un véritable rajeunissement des animaux, caractérisé par un développement plus important du squelette et des masses musculaires au détriment du tissu adipeux. Chez les porcs l'emploi du « stilbœstrol » permettrait d'éliminer l'odeur de verrat, qui est un obstacle à l'emploi de sa viande en charcuterie (SCHARNER et SCHROTER 1970 *a*), tandis que le « diéthylstilbœstrol » aurait une action légèrement favorable sur la tendreté par effet d'ionisation et de gonflement du tissu conjonctif. A noter que cette « aération » des fibres de collagène a été observée depuis longtemps dans le conjonctif des vaches traitées par les œstrogènes pour nymphomanie, ainsi que chez les vieilles vaches que l'on fait féconder une dernière fois avant l'abattage (dans ce dernier cas les œstrogènes ont également une origine placentaire). On voit donc que l'état physico-chimique du tissu conjonctif suivant l'âge et le sexe des animaux est en partie dépendant du contexte endocrinien.

Le vieillissement est caractérisé par un accroissement du nombre des liaisons chimiques aux points d'entrecroisement des molécules de tropocollagène, ce qui se traduit par un certain degré d'insolubilisation. Ces liaisons intermoléculaires sont donc à la fois un des aspects importants de la biochimie du collagène et de la tendreté des viandes. En ce qui concerne ce dernier aspect BAILLEY (1971) rapporte que les liaisons lysine et hydroxylysine (forme aldéhydique) disparaissent durant la maturation des viandes qui suit l'abattage des animaux.

A l'opposé du collagène, l'élastine possède une structure amorphe et les liaisons entre protéines dans cette chaîne sont différentes de celles qui existent dans la trame inélastique et plus ou moins rigide du collagène. L'étude de la structure moléculaire du collagène des viandes (structure quaternaire en particulier) est un sujet d'actualité. On utilise notamment des modèles permettant l'étude de la formation de fibrilles au sein du collagène soluble (KRUGGEL *et al.*, 1970 ; RADKEVITCH, 1971 ; GORBATOV *et al.*, 1971). Durant la période de croissance de l'animal, le taux de précurseurs solubles du collagène pouvant être extraits d'un tissu (peau, par exemple) est en corrélation mathématique avec le taux de croissance du collagène, lui-même fonction du temps nécessaire à l'établissement des liaisons intermoléculaires qui assurent la rigidité de l'édifice conjonctif. (PARTRIDGES, 1971). Cependant ces liaisons de covalence sont à la fois stables et labiles durant la période de jeunesse alors qu'elles tendent à devenir totalement stables durant la vieillesse (SHIMOKOMAKI, 1971), c'est pourquoi les tissus connectifs d'animaux âgés sont à peu près totalement insolubles dans la solution de Ringer (SZEREDY, 1970 *b*), d'où corrélation entre la solubilité dans la solution de Ringer et la dureté relative de la viande. L'abaissement de l'âge d'abattage des bovins qualifiés « adultes » ne peut donc qu'être un facteur favorable à la tendreté de la viande, malheureusement il n'en va pas de même pour les autres critères organoleptiques de celle-ci.

C. — *Cuissons et tissu conjonctif*

Les rapports entre la cuisson, la dégradation thermique du conjonctif et la tendreté de la viande sont extrêmement étroits lorsqu'il s'agit de morceaux riches en tissu conjonctif provenant d'animaux âgés (CHONG WON KIM *et al.*, 1967).

Le rétrécissement de la viande au cours de la cuisson a pour origine à la fois

celui des myofibrilles et celui du tissu conjonctif. Au cours de leur étude portant sur le rétrécissement du *L. dorsi* de bovins de différents âges, SCHMIDT et PARRISH (1969) constatent que :

— le raccourcissement des myofibrilles débute à 50°C environ. A 60°C les stries M disparaissent et les filaments d'actine et de myosine subissent un début de coagulation. A 70-80°C la désintégration de ces filaments est totale ;

— le rétrécissement du réseau conjonctif commence avec celui de l'endomysium aux environs de 50°C et il est total à 70°C, tandis que le rétrécissement du perimysium ne fait que débuter à 70°C.

On explique ainsi (CHRYSTALL, 1971) que la longueur des sarcomères dans la viande cuite soit en corrélation avec la tendreté, de même qu'elle l'était (voir précédemment) dans la viande crue. RAHELIC *et al.* (1969) avaient fait une remarque analogue à propos de la tendreté du jambon en fonction du diamètre des fibres musculaires. RAHELIC *et al.* (1968) avaient également constaté que des muscles contenant peu de tissu conjonctif étaient d'autant plus tendres que la surface qu'ils couvraient sous 20 kg de pression, était plus grande. De même l'étirement du *L. dorsi* de bovins durant la période de rigidité (BUCK et BLACK 1968) amincit le tissu conjonctif et après la cuisson les auteurs ont noté un taux de dénaturation (apparition de granulations) plus grand dans le tissu conjonctif des sections étirées que dans les sections non étirées. Les auteurs concluaient que la densité des liaisons intermoléculaires du collagène affecte à la fois ses caractères de solubilité dans la viande crue et ses possibilités d'hydrolyse au cours de la cuisson.

Le rétrécissement thermique de la viande est à la base de la notion d'optimum de température de cuisson (dans l'enceinte de cuisson et à cœur des morceaux). DEETHARDT (1971) a étudié cet optimum pour le *L. dorsi* de porc. L'auteur pense qu'un taux élevé de fibres de réticuline dans la fraction insoluble du conjonctif après cuisson diminue la tendreté. Ceci dit, le *L. dorsi* de porc présente le maximum de dureté lorsqu'il est cuit à une température interne de :

66°C pour des porcs d'un poids vif compris entre 68 et 82 kg
85°C pour des porcs d'un poids vif compris entre 95 et 109 kg

LAAKKONEN *et al.* (1969 *a*, 1969 *b*, 1970 *a*, 1970 *b*, 1970 *c*) ont effectué une étude très intéressante sur l'accroissement de tendreté du muscle semitendineux de bovine, ayant subi une maturation préalable et ensuite cuit à basse température. Des tranches de muscle étaient introduites dans des sacs plastiques fermés sous vide et ceux-ci étaient chauffés dans de l'eau dont on élevait la température de 30°C à 60°C de telle façon que la vitesse de pénétration de la chaleur dans la viande soit de 0,1°C/mn (durée du chauffage : 10 h). Lorsque la température interne de la viande passait de 50,5°C à 58,5°C, les auteurs enregistraient une diminution brutale de la force de cisaillement (Warner-Bratzler). Parallèlement la capacité de rétention de l'eau diminuait presque linéairement, mais restait néanmoins toujours supérieure à celle d'autres échantillons cuits à la vitesse de 0,8°C/mn. Les auteurs pensent que cette meilleure rétention d'eau, ainsi que la diminution de la force de cisaillement, lorsque la viande est cuite à la vitesse de 0,1°C/mn, est le résultat d'une activité collagénolytique prolongée qu'ils ont d'ailleurs pu mettre en évidence.

D. — *Lipides intra-musculaires et tendreté*

On dit que la viande est « persillée » ou « marbrée » lorsque son tissu conjonctif est plus ou moins riche en lipides visibles à l'œil nu, ce qui se produit lorsque l'animal est « fin gras ». Cette surcharge lipidique s'accompagne d'une diminution d'eau dans le muscle frais (corrélation hautement significative) et correspond à une accumulation de triglycérides au détriment des phospholipides (par abréviation : PL). Campbell et Harril (1971) ont pu établir, après analyse de 67 échantillons de divers muscles, l'équation : Y = 1,767 6— 0,925 6 X, dans laquelle Y = log du p. 100 de PL dans le muscle et X = log du p. 100 des lipides totaux (en poids du muscle frais). Il est intéressant de souligner à ce propos que les muscles blancs sont plus riches en glycérides et moins riches en PL que les muscles rouges (Beecher *et al.*, 1968 ; Moody *et al.*, 1968 ; Luddy *et al.*, 1970 ; Wangen *et al.*, 1971). D'après Luddy *et al.* (1970) les muscles blancs de porc renferment 20 p. 100 de lipides totaux en plus que les muscles rouges et ces lipides totaux contiennent 20 p. 100 de plus de triglycérides et 40 p. 100 de moins de PL. En outre, les acides gras essentiels ($C_{18:2}$ et $C_{20:4}$) prédominent dans les PL des muscles rouges, tandis que c'est l'acide oléique qui prédomine dans les PL des muscles blancs. Wangen (1971) a noté, chez les dindes d'élevage, que le taux de PL s'accroît avec l'activité des muscles et que leur pourcentage en fonction des lipides totaux diminue lorsque l'âge des animaux s'accroît.

Les lipides intra-musculaires comprennent : ceux renfermés dans les adipocytes du perimysium, les gouttelettes lipidiques libres intra-cellulaires et les lipides (essentiellement PL) des membranes, notamment des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique. Hood et Allen (1971) ont constaté que le taux des acides gras libres (par abréviation : AGL) s'accroissait au cours de la maturation de la viande qui fait suite à l'abattage et une corrélation de — 0,49 (significative à $P < 0,01$) a pu être établie entre le taux d'AGL intra-musculaires et l'arôme de la viande cuite. Les AGL sont issus de l'hydrolyse des triglycérides et des PL. Les PL sont davantage hydrolysés (au cours de la maturation) dans les côtes de taureau que dans celles de génisse (les côtes de bœuf sont intermédiaires) et les côtes de génisse ont de ce fait le meilleur arôme après cuisson.

A noter que sur la base du travail de Akgun et Rudman (1969) il serait intéressant d'étudier la relation pouvant exister entre les AGL et les ions calcium libres. Ces auteurs ont en effet constaté, chez le Lapin, que l'administration d'ACTH (adrénocorticotrophine hypophysaire) produisait, 3 h après, une élévation des AGL sériques en même temps qu'une hypocalcémie, le calcium migrant des liquides extra-cellulaires vers les réserves adipeuses. L'hypothèse de la formation de sels calciques d'acides gras a été envisagée et d'autres hypothèses également.

Sur le plan culinaire, il est bien connu que les viandes « marbrées » sont plus succulentes que celles qui ne le sont pas, mais la présence de ces graisses intra-musculaires en quantité importante rend-elle la viande plus tendre ? Durant la cuisson les lipides qui exsudent des adipocytes dégradent-ils le collagène qui les entoure, rendant ainsi la viande plus tendre (Reid *et al.*, 1971) ? La question du « marbré » est en plein débat aux U. S. A. En effet le « marbré » est un des principaux facteurs permettant de déterminer le « grade » (ou qualité) des carcasses de bœuf, d'après les normes

de 1965 du Département de l'Agriculture (U. S. D. A.). Pour Prost *et al.* (1971), les carcasses ne différaient même, en fait, suivant leur grade, que sur la base de leur composition : eau-graisse. La question de savoir s'il y a intérêt, ou non, à déterminer la qualité des carcasses sur leur degré de « marbré » n'est pas encore tranchée (Norris *et al.*, 1971 ; Kennick *et al.*, 1971).

ÉVENTUELLE INFLUENCE DES MICRO-ORGANISMES SUR LA TENDRETÉ DES VIANDES

Cette éventuelle influence est très mal connue et Marsh (1971) l'a déploré en ouvrant la 17e Réunion des Instituts de Recherches sur les Viandes (Bristol, septembre 1971), par contre, la flore bactérienne « normale » est bien connue (Pseudomonas, Entérobactéries, Lactobacilles et Coques divers).

En fait, pour des raisons de bonne conservation de la viande et d'hygiène alimentaire (plus spécialement en ce qui concerne la viande pré-emballée et hachée), toute contamination bactérienne est jugée indésirable (certains Lactobacilles eux-mêmes pouvant peroxyder la myoglobine), de sorte que l'aspect éventuellement positif d'une certaine contamination bactérienne sur la tendreté, a été complètement négligé. Hess et Lott (1970) ont étudié les origines de la contamination bactérienne des viandes pendant et après l'abattage, notamment par des bactéries psychrophiles lipolytiques et protéolytiques. Reville *et al.* (1971) après réfrigération de carcasses de bovins à 2°C durant 30 h, ont prélevé proprement des muscles et placés ceux-ci dans des sacs plastiques maintenus à 2°C durant 10 j. La pollution superficielle était de 100 germes/cm² lors du prélèvement et s'élevait à $2 \cdot 10^3$ germes/cm² après 10 j. Aucune bactérie n'a pu être décelée à l'intérieur des morceaux. C'est notamment cette dernière constatation, connue depuis longtemps, qui a toujours conduit à minimiser le rôle que les bactéries tolérantes au froid pouvaient jouer dans la tendreté de la viande au cours du processus de maturation. Rampton *et al.* (1970) ont inoculé de la viande prélevée aseptiquement avec : *Achromobacter liquefaciens, Micrococcus luteus, Pediococcus cerevisiae, Pseudomonas fluorescens, Streptococcus faecalis* et une culture mixte prélevée sur un hamburger-steak. L'incubation avait lieu à 3 et 10°C durant 8 et 20 j. Seul *A. liquefaciens* et la culture mixte ont bien proliféré, cependant dans aucun cas il n'y a eu de dégradation des protéines myofibrillaires. Par contre, Borton (1970) après avoir inoculé un extrait des protéines solubles dans KCl 0,6 M, préparé à partir de *L. dorsi* de porc, constate : une protéolyse sous l'influence de *Pseudomonas fragi* des protéines myofibrillaires (incubation durant 20 j à 2 et 10°C) alors que *P. cerevisiae, Leuconostoc mesenteroides* et *M. luteus* n'avaient pas d'effet. Adamcic *et al.* (1970) ont étudié l'action de bactéries psychrotolérantes sur le contenu en acides aminés de la peau de poulet stockés durant 21 j à 5°C. Les *Pseudomonas* pigmentés se sont révélés être protéolytiques et posséder une collagénase, à l'opposé des *Pseudomonas* non pigmentés et *Achromobacter* qui étaient faiblement protéolytiques. Hasegawa *et al.* (1970) ont prélevé aseptiquement des muscles de porc et de lapin, puis inoculé ceux-ci avec quatre genres bactériens et incubé les échantillons à 10°C durant 8 et 20 j en vue d'étudier la bactériolyse du reticulum sarcoplasmique et des protéines musculaires urée-solubles.

Bactériolyse du reticulum sarcoplasmique

P. fragi a montré la plus forte activité protéolytique. Elle était plus importante sur le reticulum de lapin que sur celui de porc. *P. cerevisiae* et *L. mesenteroides* ont manifesté aussi une activité protéolytique sur le reticulum de lapin, mais elle était nulle sur celui de porc. *M. luteus* n'avait qu'une faible action protéolytique sur le reticulum de lapin et elle était également nulle sur celui de porc.

Bactériolyse des protéines urée-solubles

P. fragi et *P. cerevisiae* dégradaient fortement ce type de protéines issues des muscles de porc et moins activement celles issues des muscles de lapin. Quant à *M. luteus* et *L. mesenteroides*, ils n'avaient pas d'action protéolytique mesurable sur ce type de protéines.

Les auteurs concluaient que la contamination de la viande doit être un processus complexe impliquant de nombreux micro-organismes produisant des enzymes hautement spécifiques vis-à-vis de telles ou telles protéines (ou protéines-enzymes) musculaires. Ces conclusions expliquent sans doute que le test « ERV » (Extract Release Volume) consistant à déterminer dans des conditions standardisées la solubilisation bactérienne des protéines de la viande en vue d'en déterminer rapidement son degré de contamination, soit critiquable (Miller et Price, 1971). Ces auteurs, à la suite d'une étude sur des muscles de porc, arrivent en effet à la conclusion qu'il n'y a pas de corrélation entre l'ERV et la qualité bactériologique, par contre l'ERV, est en corrélation avec les fluctuations de pH résultant de la contamination de la viande par tel ou tel genre bactérien dominant. La protéolyse d'origine fongique de la viande n'a pas non plus fait l'objet d'études très poussées. Signalons cependant qu'on a émis l'hypothèse que la contamination superficielle de la viande durant son stockage au froid par une moisissure appartenant à la classe des Zygomycètes : *Thamnidium elegans* (G. Smith, 1969) pouvait contribuer à lui donner une meilleure flaveur ainsi qu'à améliorer sa tendreté.

APPORT D'ENZYMES EN TANT QUE MOYEN POUR ATTENDRIR LA VIANDE

Ce que nous venons de dire concernant les enzymes d'origine fongique, assure la transition entre ce dernier paragraphe et le précédent, puisque c'est essentiellement cette source d'enzymes que l'on utilise pour attendrir la viande, à côté des enzymes d'origine végétale (papaïne, ficine, broméline). Craplet (1966) rappelle l'observation que Cortez aurait faite à Mexico en 1519 au sujet du traitement attendrisseur des muscles par emballage de ceux-ci dans des feuilles de papaye dès après l'abattage des animaux et on ne peut que s'interroger sur les raisons pour lesquelles l'attendrissage enzymatique de la viande s'est aussi peu développé en 450 années!

Outre l'aspect hygiénique et législatif de l'utilisation des enzymes dans les industries alimentaires, nous avons montré tout au long de cet exposé que la viande, du fait même que c'est un produit de transformation biochimique du muscle vivant,

est, comme ce dernier, un édifice moléculaire à la fois complexe, très résistant et cependant fragile. C'est ainsi qu'il est très difficile d'assurer une imprégnation homogène de la viande par des protéases, cependant, une fois que celles-ci sont à pied d'œuvre, on a l'impression de disposer d'un « marteau-pilon pour écraser une fourmi » tellement certaines structures de l'édifice musculaire apparaissent vulnérables à leur action. Les dégâts causés à l'organisme vivant lors de la diffusion accidentelle des enzymes pancréatiques dans le sang (pancréatite aiguë) soulignent bien la fragilité tissulaire face aux protéases et on peut ainsi avancer que, jusqu'en 1959, époque où l'on a commencé à injecter par voie intraveineuse de la papaïne à des bovins avant leur abattage, la principale raison qui a retardé l'attendrissage enzymatique est la difficulté de faire pénétrer les protéases à la dose voulue dans la viande et ensuite d'en contrôler leurs effets. La maîtrise du facteur thermique, qui peut être un inhibiteur ou un stimulant de l'activité des enzymes, a beaucoup contribué à l'élargissement de leur emploi.

A. — *Intérêt et limites de l'attendrissage enzymatique artificiel*

Le flanc de bœuf ordinaire fournit, en moyenne, 32 p. 100 de morceaux à rôtir ou à griller, alors que le flanc du même animal ayant reçu une injection *ante mortem* de papaïne en fournit 68 p. 100. Ces chiffres montrent bien l'intérêt des protéases pour améliorer la tendreté des morceaux de 2e ou de 3e catégorie (les plus riches en tissu conjonctif). Il ne faut pourtant pas oublier qu'en ce qui concerne le respect des autres qualités organoleptiques de la viande (flaveur et succulence) la maturation naturelle est irremplaçable et qu'il est bon de la maintenir pour les morceaux de première catégorie (les plus pauvres en tissu conjonctif). On peut cependant remarquer que, même pour ces morceaux, le degré de tendreté est fonction de la température et de la durée de la maturation (les deux facteurs étant liés). Or, pour empêcher la prolifération bactérienne à la surface de la viande, on est obligé de faire maturer celle-ci juste au-dessus de son point de congélation si cette maturation doit durer longtemps (cas du filet de bœuf par exemple). Il en résulte, à partir de une à quatre semaines de maturation, une dépense importante d'entreposage frigorifique d'une denrée chère, à laquelle il faut ajouter la « freinte » (perte d'eau par dessiccation superficielle) et souvent un parage des parties décolorées ou envahies de « limon » bactérien. Or, pour réduire ces inconvénients inhérents à une maturation prolongée, on a proposé de la faire à 15°C durant 3 jours (procédé « Tenderay ») voire même à 40°C durant 24 heures. Ceci implique, dans le premier cas, d'avoir recours aux rayons UV et dans le second aux radiations ionisantes ou aux antibiotiques, pour inhiber la microflore de putréfaction. Ces techniques posent des problèmes aussi bien sur le plan de l'hygiène alimentaire que sur celui de leur réalisation et on peut se demander si, finalement, même pour certains morceaux de première catégorie, on n'aurait pas intérêt à rechercher un compromis entre maturation naturelle et maturation artificielle? A noter que l'attendrissage enzymatique artificiel de la viande n'offre guère d'intérêt que pour le bœuf car la viande de porc, d'agneau et de volaille est généralement suffisamment tendre du fait de l'âge des animaux lors de leur abattage ainsi que du mode de cuisson. On a cependant préconisé l'injection *ante mortem* de papaïne aux vieux coqs et l'immersion dans des solutions de papaïne ou de protéases fongiques de la viande de poulet cryodesséchée lors de sa réhydratation.

B. — *Classification et différentes origines des enzymes protéolytiques utilisées pour attendrir la viande*

D'après Joseph (1970) et Scharner et Schroter (1970), les enzymes les plus utilisées proviennent de plantes tropicales (papaïne, ficine, broméline) et de moisissures (*Aspergillus orizae* et plus récemment *A. terricola*). Les protéases d'origine animale (essentiellement trypsine pancréatique) et d'origine microbienne (*Bacillus* mésophiles et thermophiles) sont moins utilisées ou alors en mélange avec les précédentes. Il faut ajouter qu'un certain nombre de protéases sont actuellement en cours d'expérimentation. Elles ont pour origine, soit des bactéries (*Streptomyces griseus*, duquel on tire la pronase), soit des moisissures (*Penicillium chrysogenum*) soit même le sang de porc ou encore les collagénases vraies et élastases (voir ci-après).

Papaïne.

La papaïne brute est du latex, desséché et pulvérisé, obtenu par incision des fruits de *Carica papaya* un peu avant leur maturité. Cette poudre papaïnique brute renferme un complexe protéasique et est parfois assez fortement contaminée par des bactéries, sporulées notamment. Elle donne donc des résultats irréguliers et peu communiquer un goût indésirable aux viandes. Il est donc souhaitable d'utiliser une papaïne mieux définie sur le plan enzymatique et plus propre au point de vue bactériologique, voire même hautement purifiée si elle doit être injectée aux animaux avant leur abattage. La papaïne est de loin la protéase la plus utilisée pour attendrir la viande. Ainsi plusieurs centaines de tonnes de latex sont exportées à cette fin chaque année aux U. S. A. Le développement du marché du bœuf « ProTen » (voir ci-après) est considérable (il s'agit de bovins qui ont reçu une injection IV *ante mortem* de papaïne) puisque 30 p. 100 des tonnages de bœuf vendus par Swift aux U. S. A. et au Canada sont du bœuf « ProTen » (contre 5 p. 100 en 1964). En Grande-Bretagne plus de 4 000 magasins libre-service et les principales sociétés coopératives de consommation vendent du bœuf « ProTen » et le nombre de consommateurs dans ce pays est estimé à un million.

Ficine.

Elle est extraite du latex des figues de *Ficus carica* ou de jeunes pousses non encore lignifiées. Solovyov *et al.* (1970) ont étudié les propriétés de la ficine, purifiée de différentes manières, comme attendrisseur de la viande. Ils ont déterminé la composition chimique des préparations, leurs différentes activités enzymatiques et leurs effets sur les myofibrilles et l'élastine. La composition chimique et les activités enzymatiques variaient suivant la source de ficine brute et les procédés de purification mis en œuvre, cependant, toutes les préparations testées attendrissaient la viande.

Bromeline.

Elle est extraite de la tige ou du jus de l'ananas frais. Elle est peu utilisée pour attendrir la viande du fait de son prix et aussi de son incapacité à hydrolyser le contenu des fibres musculaires. (Elle est seulement active sur le collagène et un peu sur l'élastine).

*Protéases d'*Aspergillus.

Les protéases d'*Aspergillus* sont assez utilisées pour attendrir la viande. A noter qu'elles le sont depuis des siècles en Orient (*Aspergillus orizae*) pour la production de sauces de soja protéolysé et d'aliments divers. Les souches de moisissures peuvent être sélectionnées sur leur pouvoir protéolytique (Nagaraja *et al.*, 1970) notamment vis-à-vis des constituants de la viande. Les protéases d'*Aspergillus* sont actives dans une large gamme de pH, ce qui est un avantage pour l'attendrissage des viandes. Elles sont commercialisées aux U. S. A. sous le nom de « Rhozyme P II ».

Mitsyk *et al.* (1971) ont étudié durant plusieurs années les effets protéolytiques sur de la viande de bœuf de solutions enzymatiques obtenues à partir d'*Aspergillus terricola*. De la viande non maturée, ou au contraire réfrigérée durant plusieurs jours, était traitée avec la solution enzymatique. Dans certains cas elle était congelée ensuite, suivant une méthode rapide pour la viande non maturée et une méthode lente pour la viande maturée. Les auteurs ont examiné, dans chaque cas : la capacité de rétention de l'eau par la viande, son degré de protéolyse et sa microstructure. Les variantes des procédés technologiques mis en œuvre après addition de la solution enzymatique, n'ont pas modifié de façon notable la capacité d'hydratation, le degré de protéolyse et la microstructure de la viande.

Protéases d'origine animale.

Les protéases d'origine animale : pancréatine, trypsine, chymyotrypsine, sont actives à des températures intéressantes (35-38°C) mais dans une gamme de pH (7 à 9) qui ne convient guère pour attendrir la viande. Des associations sont néanmoins intéressantes (voir plus loin). A signaler que Palmin *et al.* (1970) ont extrait des protéases du sang de porc et mentionné leur intérêt pour les industries de la viande et du lait.

Collagénases et élastases.

Leur utilisation n'en est encore qu'au stade expérimental. Rappelons qu'à côté des enzymes protéolytiques capables d'hydrolyser non spécifiquement le collagène, exemples : ficine, broméline, papaïne (à un degré moindre), trypsine, certaines cathepsines et la pronase (protéase de *Streptomyces griseus*), il existe des collagénases « vraies » ou spécifiques en ce sens qu'elles sont incapables d'hydrolyer les protéines globulaires. Chez les animaux et l'homme ces collagénases vraies sont essentiellement produites par les cellules épithéliales et endothéliales. (Delaunay et Bazin, 1969). Certaines bactéries, *Clostridium histolyticum* en particulier, produisent aussi des collagénases. Satterlee (1971) a étudié les effets d'une collagénase pancréatique de porc sur le tissu conjonctif de cet animal. L'extrait étudié possédait également une activité élastolytique. Vadehra et Baker (1970) dans leur revue sur les mécanismes assurant une bonne capacité de liaison de l'eau dans la viande et ses émulsions, rapportent que cette liaison peut être réduite à zéro sous l'effet de collagénases, élastases ou de la ficine. De ce fait l'emploi éventuel de telles enzymes peut être contre-indiqué.

C. — *Modes d'utilisation des enzymes*

Sels attendrisseurs.

Ces sels sont présentés généralement sous forme de poudre pouvant être utilisée en l'état ou préalablement dissoute dans de l'eau, mais on trouve également dans le commerce des solutions salines enzymatiques. Aux U. S. A. les sels attendrisseurs sont utilisés dans la cuisine familiale, les restaurants et par les distributeurs de viande réfrigérée pré-emballée ou de viande débitée vendue à l'état congelé. Ces sels attendrisseurs renferment généralement, à côté des enzymes dont il a été question au paragraphe précédent : 80 à 95 p. 100 de sel de cuisine ; très souvent des sucres réducteurs comme le dextrose (5 à 15 p. 100) et divers ingrédients à faibles doses : glutamate monosodique, ortho- et polyphosphates ; acides organiques divers ou leurs sels alcalins ; substances amylacées ; épices ; hydrolysats de protéines végétales ou concentrés de jus de viande et parfois même des agents hydratants tel le propylène-glycol.

A titre indicatif voici deux formules de ces sels attendrisseurs :

Papaïne commerciale	2
(ou protéases fongiques)	5
Dextrose	15
Glutamate monosodique	2
Sel de cuisine (q.s.p.)	100
Papaïne commerciale	4,5
Fécule de maïs	4,5
Citrate de sodium	2,0
Concentré de jus de bœuf	1,0
Sel de cuisine	88,0

A noter qu'en France la réglementation est très restrictive puisque seule la papaïne est autorisée comme attendrisseur de viande et encore dans des limites très étroites. En effet, le sel attendrisseur papaïné ne peut être utilisé qu'exclusivement au niveau de la consommation domestique. Son usage dans les boucheries, charcuteries, restaurants et d'une façon générale dans tous les établissements de préparation de viande et denrées alimentaires est interdit (Circulaire du Ministère de l'Agriculture du 25 janvier 1955). Cette circulaire prévoit que la papaïne (telle qu'elle est définie par le *Codex* 1949) doit être incorporée à du sel de cuisine dans une proportion d'au moins 2 et au plus 3 p. 100 et que le poids net des emballages ne doit pas excéder 250 g.

Le principal problème posé par l'emploi des sels attendrisseurs consiste à assurer une bonne diffusion et répartition aussi homogène que possible de ces sels dans la viande et cela n'est pas simple : le saupoudrage de la viande doit être suivi de sa multiple perforation avec une fourchette ou un appareil approprié ; l'aspersion ou l'enduction au pinceau avec des formules liquides sont peu efficaces ; l'immersion (marinade) dans une formule liquide exige un temps assez long pour être efficace et l'injection dans la viande pose des problèmes au niveau de la cuisine familiale. En tout état de cause il est bien difficile, à ce niveau, d'attendrir des morceaux dont l'épaisseur dépasse 2 à 3 cm. Par contre, l'injection (intramusculaire ou par voie vasculaire) est facilement réalisable au niveau industriel et Howard et Bouton (1960) ont obtenu de cette manière une amélioration considérable de la tendreté de cuisses

de vaches âgées. A noter que les solutions de sels attendrisseurs peuvent également servir à la réhydratation de viandes cryodesséchées ou à l'enduction de feuilles intercalaires placées entre la viande et son emballage extérieur.

Injection ante mortem *d'enzymes protéolytiques* (Procédé Swift).

Le procédé baptisé « ProTen », couvert par un brevet américain (Beuk *et al.*, 1959) consiste, pratiquement, à injecter dans la veine jugulaire des bovins 30 minutes avant l'abattage une solution à 5 p. 100 de papaïne dans du sérum physiologique. La quantité de papaïne injectée peut varier de 0,5 mg à 15 mg par *pound* de poids vif, en fonction du degré de pureté de l'enzyme. (On injecte, en général, 1,5 mg/*lb* de poids vif.) Des concentrations trop élevées (de l'ordre de 15 mg) donnent un mauvais goût à la viande. Après abattage des animaux, les carcasses sont traitées comme on le fait d'habitude, mais on réduit le temps de maturation en chambre froide. Pour les morceaux de bœuf longuement maturés, 10 à 14 jours par exemple, il suffit de 5 jours seulement dans le cas des animaux traités. Les carcasses de bœuf « Proten » fourniraient 60 p. 100 de morceaux à griller ou rôtir, contre 35 p. 100 habituellement. Il serait également possible de congeler la viande immédiatement après abattage. A noter que les vaches et bœufs âgés ou en mauvaise condition exigent des doses de papaïne supérieures à celles nécessaires à des génisses, par exemple. On a dit également que la papaïne injectée pouvait l'être sous une forme oxydée à peu près inactive, l'enzyme repassant sous sa forme réduite active au cours de la maturation. Elle agit pourtant peu durant cette phase de maturation, du fait de la température (0 à 4°C). En fait la papaïne est surtout active durant la cuisson et plus précisément entre 50 et 82°C (température à laquelle elle est totalement détruite). L'injection *ante mortem* d'enzymes protéolytiques en assure une bonne diffusion dans toute la musculature squelettique. On obtient ainsi l'attendrissage de rôtis volumineux que l'on ne peut pas attendrir par application de sels attendrisseurs.

Le procédé est également applicable aux agneaux, moutons, porcs, veaux et volailles, il offre cependant moins d'intérêt sauf pour les vieux coqs, l'injection étant alors pratiquée dans la veine humorale ou dans la cavité péritonéale (6 à 12 heures avant le sacrifice, dans ce dernier cas).

Les effets de l'injection de papaïne ont été étudiés sur les muscles de poulet (Huffman *et al.* 1967), le sang et l'urine de jeunes lapins (Cambier *et al.*, 1969), le foie de rat (Nestorov *et al.*, 1970), les muscles de rat (Nestorov *et al.*, 1971). Un inconvénient de ce procédé d'attendrissage est que les enzymes ont tendance à se concentrer dans le foie et les reins qui s'autolysent alors très vite *post mortem* en prenant une odeur désagréable de protéolysat. On recommande donc de chauffer rapidement ces organes après l'abattage des animaux pour y détruire les protéases qui s'y sont accumulées. Cependant à la dose de 1,5 mg de papaïne par *lb* de poids vif cet inconvénient est mineur. Le ramollissement excessif de la viande, dont nous allons à présent parler, est également à craindre.

D. — *Contrôle de l'attendrissage enzymatique artificiel*

L'attendrissage enzymatique artificiel peut être soit inopérant soit excessif, dans ce dernier cas la viande est exagérément molle, « laineuse », ou « cotonneuse » et présente souvent une flaveur indésirable. Un grand nombre de travaux ont été

consacrés à l'effet des protéases ajoutées à la viande qui va être cuite presque immédiatement après cette addition, ou réfrigérée durant quelques jours à quelques semaines ou encore congelée durant plusieurs mois. WANG *et al.* (1958) concluent que l'attendrissage résulte surtout d'une désintégration du sarcolemme et des fibres musculaires s'il est le résultat de l'addition de protéases fongiques ou bactériennes. A l'opposé c'est surtout le collagène et l'élastine qui sont attaqués si l'attendrissage est provoqué par l'addition de papaïne, ficine, broméline (cette dernière enzyme étant celle qui agit le moins sur les fibres musculaires). MC INTOSH *et al.* (1963) indiquent que toutes les fractions protéiques des muscles squelettiques peuvent être plus ou moins hydrolysées par la papaïne ; les mucoprotéines et le collagène l'étant cependant davantage que les autres protéines musculaires. KANG et RICE (1970) opérant sur différentes fractions de muscle de bœuf constatent que la broméline, la collagénase et la trypsine dégradent davantage le stroma que la fraction myofibrillaire. A l'opposé, la ficine, la papaïne et le Rhozyme P II, dégradent plus activement la fraction myofibrillaire que les autres. A noter que toutes ces protéases avaient peu d'action sur les protéines musculaires hydrosolubles.

Doses à utiliser.

Le degré de tendreté de la viande dépend, dans une large mesure, de la concentration en protéases qu'on y incorpore. A la limite on peut obtenir une bouillie, c'est ce qui se produit lorsque la concentration en papaïne atteint 0,04 à 0,05 p. 100 du poids de la viande. De plus on a un goût désagréable de protéolysat. A noter que c'est ce mauvais goût qui a fait exclure l'utilisation de papaïne à cette dose pour la préparation de viandes à tartiner (SCHARNER *et al.*, 1970). Pratiquement 0,001 5 p. 100 de papaïne suffisent à l'attendrissage enzymatique artificiel de la viande et à cette concentration l'enzyme ne modifie pas la flaveur.

Association de protéases.

Il est difficile d'en prévoir les effets, car l'association de protéases peut conduire à leur destruction réciproque notamment si on mélange des protéases d'origine animale et d'origine végétale. SOLOVYOV *et al.* (1970) ont cependant rapporté les heureux résultats qu'ils ont obtenus en associant la trypsine avec une protéase de *Penicillium chrysogenum*. Pour ces auteurs la tendreté de la viande a été grandement améliorée du fait que l'optimum d'activité de cette association de protéases se situait vers 50-60°C.

Optimum thermique d'activité.

Toutes les protéases dont il a été question sont très peu actives aux températures de réfrigération de la viande (0 à 4°C), voire même à la température ambiante. Mises à part les protéases d'origine animale qui sont déjà très actives à 35-38°C, l'effet attendrisseur des protéases ne se manifeste que lorsque la température de cuisson atteint 50°C environ. Comme par ailleurs elles sont détruites lorsque la température atteint 77-80°C, on peut avoir intérêt à cuire assez lentement la viande pour prolonger la durée du chauffage dans la zone 50 à 77°C et obtenir de ce fait une action protéolytique plus grande, d'où l'importance des étiquettes informatives sur les emballages des sels attendrisseurs. L'optimum thermique peut varier avec le substrat ; ainsi,

pour la papaïne, il est de 60°C avec la gélatine comme substrat et de 75 à 80° avec la fibrine. Par ailleurs, les enzymes purifiées résistent moins bien à la dénaturation thermique que les enzymes brutes.

pH et optimum d'activité.

Ce point, très important, est cependant assez complexe car l'optimum de pH varie avec le substrat. Ainsi, pour la papaïne, il est de 5 avec le collagène comme substrat et de 6,5 à 7 avec la fibrine. L'optimum de pH varie aussi avec la température : pour la papaïne, avec la caséine lactique comme substrat, l'optimum d'activité de l'enzyme se déplace vers l'acidité lorsque la température s'élève.

D'une façon générale les protéases des plantes (papaïne, ficine, broméline) ont une bonne activité aux pH normaux des viandes (pH 5,4 à 6,0), par contre, les protéases pancréatiques ont un optimum d'activité en milieu légèrement alcalin. Les protéases fongiques sont généralement bien adaptées aux pH moyens des viandes, quant à l'optimum de pH des protéases bactériennes il varie beaucoup suivant le genre bactérien considéré. A noter que la papaïne est activée par les groupements thiols (ceux de la cystéine et du glutathion notamment) ainsi que par la vitamine C.

E. — *Aspect toxicologique de l'attendrissage enzymatique des viandes*

Le large et ancien usage de préparations enzymatiques pour corriger les désordres gastro-intestinaux témoigne de l'innocuité de beaucoup d'entre elles. Une exception doit être faite en ce qui concerne les protéases fongiques, celles-ci devant être rigoureusement exemptes de mycotoxines. Cette remarque s'impose car Sosebee *et al.* (1964) évoquent l'utilisation d'*Aspergillus flavus* comme source de protéase pour attendrir la viande, or on sait que l'aflatoxine de cette moisissure est particulièrement toxique. Vissarionova *et al.* (1969) ont démontré l'innocuité d'enzymes bactériennes (protéases et amylases) destinées à l'industrie alimentaire. De plus les protéases utilisées pour l'attendrissage des viandes sont généralement détruites ou inactivées du fait de la cuisson.

SUMMARY

ENZYMES AND TENDERNESS OF MEAT

A beef carcass comprises as many cuts to be cooked slowly (about 35 p. 100) as cuts to be cooked rapidly (about 35 p. 100), and genetic improvements of animals (structure, precocity) or breeding (fattening) change these proportions only very slightly. There is an ever increasing demand by the consumer for grilling or roasting cuts to the detriment of braising or boiling, which raises the problem of the use of the « lower parts ». (It should be noted that this is augmented, in France, by the fact that consumption of steaks or roasts of minced beef of 2nd category is developing only very slowly.)

The possibilities which enzymes offer for the tenderization of meat, normally necessitating a long cooking time, is therefore of great importance from the economic point of view. However, though tenderness of the meat is the main organoleptic quality demanded by the consumer, the objective measuring of tenderness raises still more problems. Moreover, multiple factors : biological, technical and culinary, influence tenderness (or on the contrary toughness) of meat. We found it of interest to examine them as the enzymatic activities of the muscular tissue play an important role in tenderizing and a thorough knowledge of them permits the best advantages to be taken of them, or the addition of the effects of enzymes introduced by man, or the perfection of enzyme mixtures which reproduce, as faithfully as possible, the enzymatic processes of natural « maturation ».

The enzymes used, at the present time, to tenderize meat are proteases of fungal origin and more frequently plant origin (papaine, ficine, bromelin). The injection of papaine into animals before slaughter is a special case of their use which is being rapidly extended in the U. S. A., Canada and Great Britain notably. Numerous enzymatic powders are sold abroad for the tenderization of meat before and during cooking. A typical composition of these powders is the following : fungal proteases (5 p. 100) papaine (2 p. 100) dextrose (15 p. 100) monosodic glutamate (2 p. 100) and sodium chlorine. However, in France, control is very restrictive : the only « tenderizing salt » authorized (containing 2 to 3 p. 100 papaine) is reserved exclusively for domestic consumption (Ministry of Agriculture Memorandum, 25th January, 1955).

ZUSAMMENFASSUNG

ENZYME UND ZARTHEIT DES FLEISCHES

Ein Schlachtochse enthält genau soviel Fleischstücke für langsames Braten (etwa 35 p. 100) wie Stücke zum Schnellbraten (auch etwa 35 p. 100), wobei die genetische Verbesserung der Tiere oder die Aufzucht nur sehr wenig an diesen Proportionen ändern. Es besteht aber eine immer anwachsende Nachfrage der Verbraucher für Bratfleisch, wogegen die anderen Fleischqualitäten geringeren Absatz finden. (Diese Tendenz ist besonders in Frankreich stark ausgeprägt.)

Es folgt daraus, dass die Möglichkeit, die der Gebrauch von Enzymen für die Fleischverbessrung bietet, ein grosses wirtschaftliches Interesse darstellt.

Wenn die Zartheit des Fleisches die hauptsächliche organoleptische Qualität für den Verbraucher bedeutet, so wirft seine objektive Beurteilung noch Probleme auf. Anderseits beeinflussen viele Faktoren biologischer, technologischer und kulinarischer Natur die Zartheit des Fleisches. Es erscheint uns interessant, diese Faktoren einzeln zu untersuchen, denn die enzymatischen Wirkungen des Muskelfleisches spielen die Hauptrolle in der Zartmachung des Fleisches und ihre genaue Kenntnis erlaubt, einen besseren Profit zu erzielen oder diese Enzymwirkungen zu denjenigen vom Menschen beigebrachten hinzuzufügen oder Mischungen von Enzymen herzustellen, die so treu wie mögliche den natürlichen enzymatischen « Reifungsvorgang » nachahmen.

Die zurzeit für die Zartmachung des Fleisches benutzten Enzyme sind Proteasen, meist pflanzlichen Ursprungs (Papain, Ficin, Bromelin) oder auch auf Pilzbasis. Das Einspritzen von Papain in Tiere vor der Schlachtung ist ein spezieller Anwendungsfall, der in den U. S. A., Kanada und England grosse Verbreitung gefunden hat. Eine grosse Anzahl von Enzympulvern sind im Ausland im Handel, die zur Zartmachung des Fleisches vor und während des Bratens dienen. Ein solches Pulver hat z.B. folgende Zusammensetzung : Schimmelproteasen (5 p. 100), Papain (2 p. 100), Dextrose (15 p. 100), Glutamate (2 p. 100) und Kochsalz. In Frankreich dagegen ist die Gesetzgebung sehr restriktiv : das einzige Zartmachungssalz, das zugelassen ist (mit 2 bis 3 p. 100 Papaingehalt) darf nur für den Hausgebrauch dienen (Rundschreiben des Landwirtschaftsministeriums von 25-1-1955).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adamcic M., *et al.*, 1970. Effect of psychrotolerant bacteria on the amino acid content of chicken skin. *J. Food Sci.* **35**, 272-275.

Addis P. B., 1970. Oxidation of pyruvate 2-C^{14} andl actate dehydronenase activity and isoenzyme distribution of five porcine muscles. *J. Food Sci.*, **35**, 207-210.

Akgun S., Rudman D , 1969. Relationships between mobilization of free fatty acids from adipose tissue and the concentrations of calcium in the extracellular fluid and in the tissue. *Endocri- nology*, **84**, 4, 926-930.

Arakawa N., 1970. Molecular properties of *post morten* muscle. 8 Effect of *post morten* storage on actinin and the tropomyosin-troponin complex. *J. Food Sci. 1970* **35**, 703-711.

Ashley C. C., 1971. Le calcium et l'activation du muscle squelettique. *Endeavour.* **30**, 109, 18-25.

Audutskevitch V. A. *et al.*, 1971. Microstructural indices of the degree of meat ageing and spoilage. *17the European of Meat Research Workers.* Bristol.

Bailey A. J., 1971. Connective tissue proteins. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

Beecher G. R. *et al.*, 1968. A comparaison of the light and dark portions of a striated muscle. *J. Food Sci.* **33**, 84-88.

Belousov A. A. *et al.*, 1970. Ultrastructural changes in striated muscles during ageing and their influence on meat. *16th European Meeting of Meat Research Workers.* Varna.

Belousov A. A. *et al.*, 1971. Changes in the ultrastructure of the muscle surface layers of chilled meat in the process of its storage. *17 th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

Beuk J. F. *et al.*, 1959. Method of tendering meat. *U. S. Patent Office* 2, 903, 362 (sept. 8).

Bickhardt K., 1969. Méthode enzymatique pour reconnaître l'existence de lésions musculaires chez le porc vivant. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.* **76**, 601-604 et 691-694.

Boegman *et al.*, 1970. Isolation of two membrane-bound ATP-splitting enzymes from muscle homogenates. *Biochim. Biophys. Acta.* **203**, 506.

Borton R. J. *et al.*, 1970. Effects of four species of bacteria on porcine muscle. 2. Electrophoretic patterns of extracts of salt-soluble protein. *J. Food Sci.* **35**, 783-786.

Buchter L., 1970. Development of a tandardized procedure for the slaughter of experimental beef animals from the danish progeny testing station. *16th European Meeting of Meat Research Workers.* Varna.

Buchter L., 1971. Eating quality in commercial danish friesian cattle as related to sex and age. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

Buck E. M., Black D. L., 1968. Microscopic characteristics of cooked muscles subjectetd to stretch-tension during *rigor*. *J. Food Sci.* **33**, 464-467.

Cagle E. D. *et al.*, 1970. Some *post morten* changes in porcine muscle held at 25°C. *J. Food Sci.* **35**, 260-262.

Caldwell K. A. *et al.*, 1969. Sulfhydryl content of excised chicken breast muscle during *post morten* aging. *J. Food Sci.*, **34**, 290-291.

Cambier D. *et al.*, 1969. Étude des modifications sériques et urinaires provoquées chez de jeunes lapins par injections intraveineuses de papaïne brute. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 891-907.

Campbell A. M., Harrill L. T., 1971. Phospholipid concentration estimated from total muscle lidid. *J. Food Sci.* **36**, 837.

Campion D. R. *et al.*, 1971. Use of whole-body perfusion in the study of muscle glycolysis. *J. Food Sci.*, **36**, 545-548.

Charpentier J., 1968. Glycogénolyse *post morten* du muscle *Longissimus dorsi* de porc. *Ann. Zootech.* **17**, 429-443.

Charpentier J., Goutefongea R., 1969. Aspects physiologiques et biochimiques de la myopathie exsudative et dépigmentaire du porc. *Bull. Institut Technique du Porc*, n° 6, 25-53.

Charpentier J., 1970. Relation entre la réaction physiologique du porc à une hyperthermie et le caractère exsudatif du tissu musculaire. *16th European Meeting of Meat Research Workers.* Varna.

Chong Won Kim *et al.*, 1967. Collagen content and subjective score for tenderness of connective tissue in animals of different ages. *J. Food Sci.* **32**., 586-588.

Chrystall B. B., 1971. Eating quality of bull and steer beef assessed by sensory and objective methods. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

Cooper C. C. *et al.*, 1969. Capillary distribution and fiber characteristics in skeletal muscle of stress-susceptible animals. *J. Food Sci.*, **34**, 299-302.

Cormier A. *et al.*, 1971. Epimysial connective tissue polysaccharide of bovine semimenbranosus muscle and alterations in their type with âge and sex differences. *J. Food Sci.*, **36**, 199-206.

Craplet C., 1966. *La viande de bovins.* Livre I (p. 1 à 486). Vigot Frères. Édit. Paris.

Davey C. L., Dickson M. R., 1970. Studies in meat tenderness. 8. Ultra-structural changes in meat during aging. *J. Food Sci.*, **35**, 56-60.

Deethardt D., 1971. A histological evaluation of connective tissue in *longissimus dorsi* muscle of raw and cooked pork. *J. Food Sci.*, **36**, 563-565.

Delaunay A., Bazin S., 1969. Le collagène. II - Répartition et rôle du collagène chez les animaux et l'homme. *La Presse Médicale.* **77**, 755-756.

Dumont B. L., 1966. Réflexions sur la qualité et la qualification des viandes. *L'alimentation et la vie* **48**, 1-2-3, 51-56.

Dumont B. L., 1971. Meat toughness index of beef carcasses. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

Etherington D. J., 1971. The enzymic breakdown of collagen. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

Field R. A. *et al.*, 1969. Epimysial connective tissue scores as related to beef tenderness. *J. Food Sci.*, **34**, 514-518.

Fremery (de) D. *et al.*, 1963. The influence of *post partum* glycolysis on poultry tenderness. *J. Food Sci.* **28**, 173-176.

Frouin A., 1971. Explication quasi totale du pouvoir de rétention d'eau des viandes de porc 24 H. *post mortem* par l'action combinée du pH et du taux de calcium ionisé. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

FUKAZAWA T., 1970. Some properties of myofibrillar proteins obtained from low ionic strength extracts of washed myofibrils from *pre-* and *post rigor* chicken pectoral muscle. *J. Food Sci.*, **35**, 464-468.

GACULA *et al.*, 1971. Statistical aspect of the correlation between objective and subjective measurements of meat tenderness. *J. Food Sci.* **36**, 185-189.

GORBATOV *et al.*, 1971. Studies into the amino-acid composition of connective tissue during its solubilisation and reconstitution. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

GOUTEFONGEA R., 1969. Étude du pouvoir de rétention d'eau de la viande de porc. II. Influence du calcium et du magnésium. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **9** (1), 117-122.

GREASER M. L., *et al.*, 1969. The effect oh pH-temperature treatments on the calcium-accumulating ability of purified sarcoplasmic reticulum. *J. Food Sci.* **34**, 633-637.

HANSEN L. J., 1971. Development and application of Armour Tenderometer for measuring tenderness of beef carcasses. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

HARRIS P. V. *et al.*, 1971. Effects of some post-slaughter treatments on the mechanical properties of meat. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

HASEGAWA T., *et al.*, 1970. Effects of microbial growth upon sarcoplasmic and urea-soluble proteins from muscle. *J. Food Sci.* **35**, 510-513.

HEFFRON J. J. A., 1971. Relative activities of the adenosinetriphosphatase enzymes in frog and pig skeletal muscle. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

HENRY M., 1957. Sur l'accroissement du potassium sérique chez le porc sous l'effet de l'électrochoc. *C. R. Soc. Biol.* **151**, 325-326.

HENRY M. *et al.*, 1958. La myopathie exsudative dépigmentaire du porc, maladie de l'adaptation. Essai pathogénique et conséquences pratiques. *Rev. Path. Gén. et Phys. Clin.* n° 696, 355-395.

HENRY M., 1961. Action du volume d'eau ingéré et du rapport sodium/potassium sur le fonctionnement surrénalien. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* (C. N. R. S.) vol. 15 (425 p.) n° 1, B 133-B 164.

HENRY M., 1963. Adiposité des carcasses et myopathie exsudative et dépigmentaire chez le porc. *Cahiers des ingénieurs agronomes* n° 176, 9-14, et n° 178, 25-33.

HERLIHY E. *et al.*, 1971. The effect of strech on the ultrastructure of a *rigor* shortened muscle. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

HESS E., LOTT G., 1970. Contamination de la viande pendant et après l'abattage. *Die Fleischwirtschaft* n° 1, 47-50.

HOOD R. L., ALLEN E., 1971. Influence of sex and *post mortem* aging on intramuscular and subcutaneous bovine lipids. *J. Food Sci.* **36**, 786-790.

HOOF (van) J., HAMM R., 1971. Influence of diphosphate on the break-down of ATP and glycogen in minced salted beef. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

HOSTETLER R. L., 1970. Improving beef tenderness by preventing muscle shortening in the carcass. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

HOWARD A., BOUTON P. E., 1960. Modification de la viande par injection. *6th European Meeting of Meat Research Workers*. Utrecht.

HUFFMAN D. L. *et al.*, 1967. The effect of *ante mortem* injection of papain on tenderness of chickens. *Poultry Sci.*, **40**, 1627-1630.

JOSEPH R. L., 1970. Production of tender beef. *Process Biochemistry* (november), 55-58.

JUILLERAT M. E., 1971. Quality traits associated with consumer preference for beef. *J. Food Sci.*, **36**, 770-773.

KANG C. K., RICE E. E., 1970. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J. Food Sci.* **35**, 563-565.

KENNICK W. H., *et al.*, 1971. Effect of marbling and other variables on case life on New York steaks. *J. Food Sci.* **36**, 767-769.

KHAN A. W., 1971 *a*. Effect of temperature during *post morten* glycolysis and dephosphorylation of high energy phosphates on poultry meat tenderness. *J. Food Sci.*, **36**, 120-121.

KHAN A. W., 1971 *b*. Influence of *post mortem* glycolysis and dephosphorylation of high energy phosphates on poultry tenderness. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

KOLANOWSKI J. *et al.*, 1971. L'influence de l'effort en ambiance chaude sur la sécrétion corticosurrénale. *An Endocrin.* **32**, 314-322.

KOPP J., VALIN C., 1971. Contribution à l'étude de l'action de la cathepsine D sur certaines structures musculaires : myofibrilles et collagènes. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

KRUGGEL *et al.*, 1970. Physical and chemicla properties of epimysial acid-soluble collagen from meats of varying tenderness. *J. Food Sci.*, **35**, 106-110.

KRYLOVA N. N., 1971 *a*. A study on the interconnection between sensory scores to the quality of beef and its physico-chemical characteristics. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

KRYLOVA N. N. *et al.*, 1971 *b*. Effect of depolarizing myorelaxants on muscle tissue changes post slaughter. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

KRZYWICKI K., 1971. Relation of ATP-ase activity and calcium uptake to *post mortem* glycolysis. *J. Food Sci.* **36**, 791-794.

KUCHLING E. *et al.*, 1970. The influence of refrigeration on lowering loses in P S E pork. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

LAAKKONEN E., 1969 *a*. Collagenolytic activity and water-holding capacity as factors affecting tenderness during low-temperature long-time heating of bovine muscle. *Doct. Philosophy Food Sci. Cornell Univ.* p. 1-214.

LAAKKONEN E. *et al.*, 1969 *b*. Tenderizing effect of low-temperature long-time heating on bovine muscle. *15th European Meating of Meat Research Workers*. Helsinki.

LAAKKONEN E. *et al.*, 1970 *a*. Low-temperature, long-time heating of bovine muscle. I. Changes in tenderness, Water-binding capacity, pH, and amount of water-soluble component. *J. Food Sci.* **35**, 175-177.

LAAKKONEN E. *et al.*, 1970 *b*. Low-temperature, long-time heating of bovine muscle. 2. Changes in electrophoretic patterns. *J. Food. Sci.* **35**, 178-180.

LAAKKONEN E. *et al.*, 1970 *c*. Low-temperature, long-time heating of bovine muscle. 3. Collagenolytic activity. *J. Food Sci.* **35**, 181-183.

LACOURT A., 1970. Influence de la température et du pH sur le taux de calcium libre du tissu musculaire et sur l'activité ATP-asique de la myosine. *Journées Nles du Froid*. Grenoble (7-9 octobre).

LACOURT A., CHARPENTIER J., 1971. Contribution à l'étude de la contracture provoquée par le froid. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

LISTER D., 1970. The effects of pre-slaughter injection of magnesium sulphate on glycolysis and meat quality in the pig and steer. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

LUDDY F. E. *et al.*, 1970. Color and the lipid composition of pork muscles. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **47** (2), 65-68.

LUTALO-BOSA A. J., MACRAE H. F., 1969. Hydrolytic enzymes in bovine skeletal muscle. 3. Activity of some catheptic enzymes.*J. Food Sci.*, **34**, 401-407.

MC CLAIN P. E. *et al.*, 1969 *a*. Relationship of water binding and pH to tenderness of bovine muscles. *J. Animal Sci.* **29**, 268-271.

MC CLAIN P. E., PEARSON A. M., 1969 *b*. Connective tissues from normal and pale, soft and exudative (PSE) porcine muscles. 2. Physical characterization. *J. Food Sci.* **34**, 306-308.

MC CLAIN P. E. *et al.*, 1970. Effect of *post mortem* aging on isolation of intramuscular connective tissue. *J. Food Sci.* **35**, 258-259.

MC CRAE S. E. *et al.*, 1971. Studies in meat tenderness. 9. The tenderness of various lamb muscles in relation to their skeletal restraint and deley before freezing. *J. Food Sci.* **36**, 566-570.

MC LOUGLIN J V., 1970. Muscle contraction and *post mortem* pH changes in pig skeletal muscle. *J. Food Sci.* **35**, 717-719.

MC INTOSH E. N., 1961. Determination of mucoprotein in skeletal muscle. *J. Agr. Food Chem.* **9**, 421-424.

MC INTOSH E. N., *et al.*, 1963. The effect of papain preparations on beef skeletal muscle proteins. *J. Food Sci. 1963*, n° 28, 283-285.

MC INTOSH E. N., 1965. Isolation of mucoprotein in bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.* **30**, 986-990.

MC INTOSH E. N., 1966. Characterization of mucoprotein in bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.* **31**, 337-343.

MARSH B. B., 1971. The impact of muscle physiology on meat research. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

MICHAEL E. *et al.*, 1971. Bovine muscle tenderness as related to protein solubility. *J. Food Sci.* **36**, 190-193.

MILLER L. S., PRICE J. F., 1971. Extract release volume (ERV) responses with aseptic and inoculated pork. *J. Food Sci.* **36**, 70-73.

MITSYK V. E. *et al.*, 1971. Certain characteristics of beef during various technological treatment as effected with the proteolytic enzymic preparation products of Aspergillus terricola. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

MOLLER J., 1970. Observations of meat tenderness in bovine M. *longissimus dorsi*. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

MOODY W. G. *et al.*, 1968. A quantitative and morphological study of bovivine *longissimus* fat cells *J. Food Sci.* **33**, 47-52.

NAGARAJA R. K., *et al.*, 1970. Studies on fungal proteolytic enzymes. I. Selection and evaluation of strains to hydrolyze proteins of animal and plant origin. *J. Food Sci. Technology* (Mysore, India), **7** (1), 26-30.

NESTOROV N. *et al.*, 1970. Effect of some plant proteases injected *in vivo* in the enzymatic activity of liver tissue. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

NESTOROV N. *et al.*, 1917. Influence of plant proteases upon the structure and enzymatic activity of skeletal muscles. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

NEWBOLD R. P., SCOPES R. K., 1971. *post mortem* glycolysis in ox skeletal muscle : effects of mincing and of dilution with or without addition of orthophosphate. *J. Food Sci.* **36**, 209-214.

NORDIN H. R., 1971. A study of PSE pork in Canada. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

NORRIS H. L. *et al.*, 1971. Effects of physiological maturity of beef and marbling of rib steaks on eating quality. *J. Food Sci.* **36**, 440-444.

ONO K., 1970. Lysosomal-type enzymes in beef *longissimus dorsi* muscle. *J. Food Sci.*, **35**, 256-257.

ONO K., 1971. Lysosomal enzyme activation and proteolysis of bovine muscle. *J. Food Sci.* **36**, 838-839.

PALMIN V. V. *et al.*, 1970. Les protéases des leucocytes. *Izvest. vyssh. uchebn. Zaved. pishch. Tekhnol. S. S. S. R.* nº 1, 29-31.

PARRISH F. C. *et al.* Effect of *post mortem* aging time and temperature on beef muscle attributes. *J. Animal Sci.* **29**, 398-403.

PARTRIDGES S. M., 1971. Progress in the study of connective tissues and some intercations with the muscle during growth. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

PASSBACH F. L. *et al.*, 1968. Influence of aldosterone on PSE pork muscle. *J. Animal Sci.*, **27**, 1145.

PASSBACH F. L. *et al.*, 1969 *a*. Aldosterone influence on Na^+ and K^+ of PSE muscle. *J. Animal Sci.* **28**, 128.

PASSBACH F. L. *et al.*, 1969 *b*. Influence of aldosterone on pale, soft, exudative (PSE) porcine muscle. *15th European Meeting of Meat Research Workers.* Helsinki. 64-67.

PASSBACH F. L. *et al.*, 1970. Influence of aldosterone on the quality of porcine muscle. *J. Animal Sci.* **30**, 507-513.

PAUL P. C. *et al.*, 1970. Textural and histologic differences among three muscles in the same cut of beef. *J. Food Sci.* **35**, 505-510.

PLAS F., COUSTEAU J. P., 1968. La fatigue chez le sportif. *Vie Méd.* **49**, 725-729.

PROST E., *et al.*, 1969. Beef tenderness in relation to connective tissue. *15th European Meeting of Meat Research Workers.* Helsinki.

PROST E. *et al.*, 1971. Basic composition of bovine meat veal and beef in relation to individual muscles. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

RADKEVITCH D. P. *et al.* The influence and low temperatures and acid-cryolytic effect upon pork skin collagen. *16th European Meeting of Meat Research Workers.* Varna.

RAHELIC R. *et al.*, 1968. Relation between connective tissue content and WHC in some pig and beef muscles. *14th European Meeting of Meat Research Workers.* BRNO.

RAHELIC S. *et al.*, 1969. Some characteristics of the largest muscles of ham. *15th European Meeting of Meat Research Workers.* Helsinki.

RAMPTON J. H., *et al.*, 1970. Effect of microbial growth upon myofibrillar proteins. *J. Food Sci.*, **35**, 510-513.

REID H. C., 1971. Effects of dry and moist heat on selected histological characteristics of beef semimembranosus muscle. *J. Food Sci.* **36**, 206-208.

REVILLE W. J., 1971. Structural changes during the *post rigor* storage of some large beef muscles *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

RHODES D. N., 1971. Beef grading for the consumer. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

ROSSET R., ROZIER J., 1965. Problèmes enzymatiques concernant les viandes : Maturation, Procédés divers de conservation. *Ann. Nutr. Alim.* **22**, B 443-B 494.

SALE P. *et al.*, 1970. Problèmes posés par la détermination des modifications de la structure du muscle au cours de la maturation. *16th European Meeting of Meat Research Workers.* Varna.

SALE P., 1971. Évolution de quelques propriétés mécaniques du muscle pendant la maturation. *17th European Meeting of Meat Research Workers.* Bristol.

SATTERLEE L. D., 1971. Effect of a porcine pancreatic collagenase on muscle connective tissue. *J. Food Sci.* **36**, 130-132.

SCHALLER D. R., POWRIE W. D., 1971. Scanning electron microscopy of skeletal muscle from rainbow trout, turkey and beef. *J. Food Sci.* **36**, 552-559.

SCHARNER E., SCHROTER G., 1970 *a*. Tendreté de la viande. III. Étude des possibilités d'amélioration. *Fleisch.* **24** (h. 9) 235-237.

SCHARNER E., SCHROTER G., 1970 *b*. La tendreté de la viande. IV. Les effets des enzymes protéolytiques sur la tendreté de la viande. *Fleisch* **24** (h. 10), 268-271.

SCHMID P., 1968. Observations sur le pH et la couleur de la viande porcine. *Schweiz. Landwirt. Monotschefte.* **46**, 349-356.

SCHMIDT G. R. *et al.*, 1970 *a*. Relationship of calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum to tension development and *rigor mortis* in striated muscle. *J. Food Sci.* **35**, 574-576.

SCHMIDT G. R., 1970 *b*. Changes in tension and certain metabolites during the development of *rigor mortis* in selected red and white skeletal muscles. *J. Food Sci.* **35**, 571-573.

SCHMIDT J. G., PARRISH Jr F. C., 1971. Molecular properties of *post mortem* muscle. 10. Effect of internal temperature and carcass maturity on structure of bovine *longissimus*. *J. Food Sci.* **36**, 110-119.

SCHON L., 1969. La qualité de la viande crée-t-elle des limites à la sélection des porcs? Critères quantitatifs de la valeur des carcasses. *Schweinezucht und Schweinemast.* Nº 11, 325-326.

Scopes R. K., 1971. Mechanisms controlling glycolysis in muscle. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

Shimokomaki M., 1971. Meat tenderness : changes in the intramuscular collagen with age. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

Smith G., 1969. *An introduction to industrial mycology*. 1-390. Sixth édition. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London.

Smith G. C. *et al.*, 1971. Effects of physical and mechanical treatments on the tenderness of the beef *longissimus*. *J. Food Sci.* **36**, 445-449.

Solovyov V. I. *et al.*, 1970. On the compatibility of some proteinases and on the increase of their effect upon meat. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

Sosebee M. E. *et al.*, 1964. The effects of enzyme addition on the quality of freeze-dehydrated chicken meat. *Food Technology*. 551-554 (april).

Szeredy I., 1970 *a*. Teneurs en hydroxyproline et rapports de solubilité de différents tissus conjonctifs *Die Fleischwirtschaft*. **55**, (3), 343-345 (4), 481-482.

Theoharova B. *et al.*, 1970. Contribution for determining some physiological parameters in the field of industrial pig production. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

Thouvenot C., 1971. Consommation de la viande dans les villes et campagnes lorraines. *Cah. Nut. Diét.*, **6**, 2, 21-43.

Vadehra D. V., Baker R. C., 1970. The mechanism of heat initiated binding of poultry meat. *Food Technology*, **24**, 766-775-778-779.

Vague J., 1969. Alimentation, activité musculaire et dyspondérose chez l'adulte. *Rev. Fce de Diététique*, **13**, n° 50, 25-28.

Valin C., Sale P., 1970. Problèmes posés par la détermination des modifications de la structure du muscle au cours de la maturation. *16th European Meeting of Meat Research Workers*. Varna.

Vissarionova V. *et al.*, 1969. Influence sur des organismes animaux d'enzymes bactériennes destinées à être employées dans l'industrie alimentaire. *Voprosi Pitanijia* (Moskwa) **28** (5), 41-46.

Vold E. *et al.*, 1965. *Post-mortem* changes in meat characteristics in the pig together with a further contribution to the methodology of meat quality investigations. *Die Fleischwirtschaft*, n° 8, 938-942.

Vold E. *et al.*, 1965. Altération *post-mortem* des propriétés des viandes de porc. Contribution aux méthodes d'investigation de la qualité. *Die Fleischwirtschaft*, n° 8, 938-942.

Voyle C. A., 1971. Sarcomere length and meat quality. *17th European Meeting of Meat Research Workers*. Bristol.

Wang H. *et al.*, 1958. Studies on enzymic tenderization of meat. III. Histological and panel analyses of enzyme preparations from three distinct sources. *Food Redearch*, **23**, 423-438.

Wangen R. M. *et al.*, 1971. Influence of age on total lipids and phospholipids of turkey muscle. *J. Food Sci.*, **36**, 560-562.

Weiner P. D., Pearson A. M., 1969. Calcium chelators influence some physical and chemical properties of rabbit and pig muscle. *J. Food Sci.*, **34**, 592-596.

Wilson B. W., 1968. Cholinesterases activity and inherited muscular dystrophy of the chicken. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 199-206.

Wipf V. K., Mullins A. M., Passbach Jr., F. L., 1970. Variation in acid mucopolysaccharide content of porcine muscles. *J. Animal Sci.*, **30**, 360-363.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 423-433.

SOLUBILISATION ENZYMATIQUE CONTINUE DU CONCENTRÉ PROTÉIQUE DE POISSON. ESSAI DE RECYCLAGE DES ENZYMES

C. CHEFTEL

Laboratoire de Biochimie alimentaire,
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
34 - Montpellier (France)

RÉSUMÉ

Le concentré protéique de poisson préparé par extraction de l'eau et des lipides à l'*iso*-propanol contient moins de 0,5 p. 100 de lipides et environ 85 p. 100 de protéines, presque entièrement insolubles. Divers procédés de solubilisation peuvent être envisagés, en vue d'utilisation pour l'enrichissement en protéines de boissons, de potages, ainsi que d'aliments spéciaux, par ex. infantiles, prédigérés, instantanément solubles etc. Les recherches présentes ont été entreprises pour établir s'il est possible de réaliser, à l'échelle de l'atelier pilote, une solubilisation par protéolyse enzymatique, avec addition continue de substrat et, de préférence, séparation des produits d'hydrolyse et des enzymes par ultrafiltration, afin de réutiliser ces dernières.

Deux préparations enzymatiques ont été retenues : la Pronase (*Streptomyces griseus*), qui permet une solubilisation rapide de 95 p. 100 des matières azotées ; la Monzyme (*Bacillus subtilis*), préparation beaucoup moins coûteuse mais aussi moins active. Les effets du pH, de la température, des concentrations en substrat et en enzyme sur la vitesse de solubilisation, sur la stabilité des enzymes et sur certaines caractéristiques des produits d'hydrolyse, ont été étudiés.

Un premier système continu a été réalisé en plaçant une solution de Pronase dans un réacteur homogène limité par une membrane d'ultrafiltration retenant les protéases mais perméable aux produits d'hydrolyse.

Dans un second système, la solubilisation continue du concentré protéique a été effectuée avec addition (et perte) continue de Monzyme. Le taux de solubilisation à l'équilibre a été calculé à partir des données obtenues de façon discontinue. Les conditions d'opération utilisées empêchent la croissance bactérienne et donnent un produit final convenable.

INTRODUCTION

Les recherches qui vont être présentées ont été effectuées au Département de Nutrition et Sciences alimentaires du Massachusetts Institute of Technology. Elles ont porté sur la solubilisation enzymatique continue du concentré protéique de poisson, avec ou sans recyclage des protéases (1).

Avant d'aborder les études de technologie enzymatique, je voudrais indiquer ce qu'est le concentré protéique de poisson, ce produit destiné à l'alimentation humaine, et préparé à partir de poissons non commercialisés frais ou en conserves.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le concentré protéique que nous avons utilisé a été préparé, dans les laboratoires du Bureau américain des Pêches, de la façon suivante : les poissons entiers sont broyés, et l'eau et les lipides alors extraits, à 95°C, par de l'*iso*-propanol. La poudre obtenue après séchage contient moins de 0,5 p. 100 de lipides, moins de 2 p. 100 d'eau, environ 85 p. 100 de protéines et 12 p. 100 de sels minéraux. Elle est de couleur claire et très neutre de goût et d'odeur. Sa valeur nutritionnelle est élevée, surtout lorsqu'elle est préparée de façon convenable, c'est-à-dire en premier lieu à partir de poisson frais. Le rapport d'efficacité protéique est alors un peu supérieur à celui de la caséine. Le produit est très stable à l'entreposage, du fait de la faible teneur en eau et en lipides.

Divers types de concentrés protéiques de poisson sont produits industriellement dans plusieurs pays, par exemple U. S. A., Suède, Maroc, Chili, Canada. Le prix de revient aux U. S. A. est évalué à 4-5 F/kg, soit environ 5-6 F/kg de protéine.

Ces protéines peuvent être utilisées dans les pays en voie de développement comme dans les pays plus industrialisés, pour l'enrichissement des farines, en vue de la fabrication de pain, de biscuits, de pâtes alimentaires, et également pour la préparation de produits à base de viande : plats cuisinés, saucisses etc.

Ces protéines sont cependant presque entièrement insolubles et même difficiles à disperser dans un milieu aqueux. Seulement 20 p. 100 de l'azote est soluble dans de l'eau. Un traitement de solubilisation est donc nécessaire en vue de l'utilisation de ce concentré pour la supplémentation en protéines de boissons, de potages, ainsi que d'aliments spéciaux, par exemple infantiles, prédigérés, instantanément solubles.

Les traitements de solubilisation des protéines de poisson ne passent pas tous par le concentré protéique. Ainsi la préparation du Nuoc Mam se fait par autolyse lente des poissons en présence de chlorure de sodium. De tels procédés autolytiques peuvent d'ailleurs être accélérés par addition de protéases. On étudie aussi la solubilisation des protéines d'homogénats de poisson par fermentation, par exemple avec des levures comme *Candida lipolytica*, capables de consommer une partie des lipides du poisson et de sécréter des protéases. Il est encore possible d'extraire les protéines de poisson par solubilisation dans des solutions salines ou alcalines (2).

Cependant la préparation du concentré protéique de poisson à l'aide d'un solvant organique comme l'*iso*-propanol demeure un des procédés les plus satisfaisants du point de vue économie et qualité, stabilité du produit en particulier. Cette préparation peut encore être améliorée ; en effet un traitement moins dénaturant, par exemple à température plus basse, rendrait vraisemblablement les protéines plus aisées à solubiliser.

La solubilisation du concentré protéique de poisson a d'abord été recherchée par voie chimique. On sait que l'hydrolyse acide des protéines ne convient pas car elle détruit certains acides aminés, et surtout le tryptophane. Un procédé rapide de solubilisation par la soude a été mis au point, à pH 12,5 et 95°C. Il provoque cependant la racémisation de plusieurs acides aminés, ce qui abaisse vraisemblablement la valeur nutritionnelle. Il exige aussi une neutralisation qui élève la teneur en sel du produit (3).

Nous avons alors étudié la solubilisation enzymatique par diverses protéases, seules ou en conjonction, d'origine animale, végétale ou microbienne. La pepsine, la pancréatine et la Pronase se sont révélées les plus efficaces, sur une base pondérales en ce qui concerne à la fois la vitesse de solubilisation de l'azote, et le pourcentage final de solubilisation obtenu, proche de 95 p. 100. Ce pourcentage final ne dépend pas de la pureté de la préparation enzymatique car il est déterminé avec un excès d'enzyme. Indiquons que l'azote soluble est évaluée par micro Kjeldahl, dans un surnageant de centrifugation (1, 4).

La Pronase provient de *Streptomyces griseus* et contient une dizaine d'enzymes protéolytiques de spécificités différentes, avec une zone de pH optimum de 7 à 9 (cf. 1).

La saveur des hydrolysats obtenus diffère selon les enzymes utilisées. L'hydrolysat résultant de l'action de la pepsine, à pH 2, contient des peptides extrêmement amers. La Pronase provoque au contraire un goût agréable de viande, tandis que la pancréatine, à pH 8, donne un hydrolysat acceptable, de goût assez neutre. Il en est de même de celui que l'on obtient avec une préparation de protéases neutres et alcalines de *Bacillus subtilis*, la Monzyme PAI ™ de Monsanto (5). La Monzyme, à pH 9 ou 7, ou même sans régulation de pH, permet d'obtenir un maximum de 83 p. 100 de solubilisation de l'azote du concentré protéique de poisson.

L'action de quelques mélanges d'enzymes a été étudiée ; nous avons observé de faibles effets synergiques, en particulier entre Monzyme et papaïne.

On peut signaler ici que, courant 1970, le prix des préparations de protéases de *Bacillus subtilis* était tombé à environ 10 F le kg, du fait de leur utilisation massive dans les détergents. Les variations de prix des enzymes ajoutent à la complexité des essais d'optimisation d'un traitement enzymatique.

Pour la suite de nos recherches, deux préparations enzymatiques ont été retenues :

1° la *Pronase*, en raison de son activité et malgré son prix, en vue de l'étude d'un système permettant le recyclage et la réutilisation des protéases, à l'aide de membranes d'ultrafiltration. Pour la réalisation d'un tel système, il importait d'étudier d'une part la séparation de la Pronase et des peptides solubles par ultrafiltration, d'autre part la stabilité des enzymes au cours même de leur action.

2° la *Monzyme* a aussi été retenue, en tant que préparation enzymatique la moins chère. On peut calculer qu'en utilisant un rapport pondéral enzyme/substrat de 1 p. 100, le coût de l'enzyme pour le traitement de solubilisation représente environ 2 p. 100 du prix du concentré protéique de poisson à solubiliser. Il est alors peut-être inutile d'essayer de recycler et réutiliser l'enzyme. On peut ajouter que la solubilisation incomplète sous l'action de la Monzyme n'est pas nécessairement un inconvénient car les résidus protéiques non solubilisés peuvent être employés, en alimentation animale par exemple.

Les conditions optimum de solubilisation enzymatique ont été recherchées, par essais de protéolyse discontinue d'une suspension aqueuse de concentré protéique de poisson. Les effets du pH, de la température, de la concentration en enzyme et en concentré protéique ont été étudiés. La présentation rapide des résultats biochimiques qui suit montre l'interdépendance de ces effets.

RÉSULTATS DES ESSAIS DE SOLUBILISATION

A. — *Par la Pronase*

En ce qui concerne la *Pronase*, les essais discontinus ont été réalisés dans l'optique d'un réacteur continu homogène limité par une membrane d'ultrafiltration retenant les enzymes et protéines même solubles de poids moléculaires supérieurs à 10 000 environ, mais laissant passer les peptides.

Avec la Pronase donc, une zone de pH optimum 7,8 à 8,5 est observée, et une opération avec maintien du pH à 8 est adoptée.

L'effet de la température est complexe : pour un temps d'hydrolyse court (2 heures) correspondant à une solubilisation incomplète, il est avantageux d'opérer à 55°C. Cependant pour un temps plus long et une solubilisation de 95 p. 100, il n'est pas utile de dépasser 40°C. Ceci est d'autant plus net que pour réutiliser la Pronase en continu, il importe d'opérer dans des conditions favorables à sa stabilité. Une étude de la stabilité de la Pronase a d'abord révélé qu'à pH 8, après 5 heures à seulement 34°C, l'activité d'une solution aqueuse de Pronase avait baissé de 50 p. 100. Cette perte correspond très vraisemblablement à une digestion de certaines des enzymes protéolytiques par elles-mêmes ou par les autres protéases présentes. L'addition d'ions calcium et surtout de concentré protéique de poisson protègent partiellement les enzymes contre cette autodigestion : nous avons pu mesurer que l'activité enzymatique perdue au cours même d'une opération discontinue de solubilisation à 34°C pendant 8 heures représente environ 30 p. 100 de l'activité initiale. Cette autodigestion limite certes l'intérêt d'une éventuelle réutilisation de la Pronase, mais il n'est pas exclu qu'elle soit moins importante lors d'un procédé avec addition continue de substrat protéique.

Les mesures d'activité enzymatique résiduelle au cours même des réactions ont fait apparaître un autre phénomène, d'ailleurs fréquent en enzymologie : les produits de la réaction inhibent nettement l'activité enzymatique. Dans un réacteur à membrane d'ultrafiltration, il importe que ces inhibiteurs ne soient pas retenus par la membrane et donc concentrés. Nous reviendrons sur ce point.

En début de solubilisation, la vitesse de solubilisation est proportionnelle à la concentration en enzyme. Dans le cas du recyclage d'une enzyme stable, il serait donc particulièrement avantageux d'opérer à très haute concentration en enzyme. Ceci correspondrait à un gain de temps, c'est-à-dire, sur la base d'une production donnée, à un gain de volume de réacteur. Nous avons cependant observé que l'autodigestion des protéases augmentait avec la concentration de la solution enzymatique. Pour la suite de nos essais, nous avons retenu un rapport pondéral enzyme/substrat de 1 p. 100.

La concentration de concentré de poisson en suspension influence également la vitesse de solubilisation. Lorsque cette concentration dépasse 10 p. 100, un effet inhibiteur est observé.

La première figure montre la cinétique de solubilisation du concentré protéique de poisson à 34°C, sur la courbe du haut. La cinétique de rupture des liens peptidiques a aussi été déterminée, et est indiquée sur la courbe du bas.

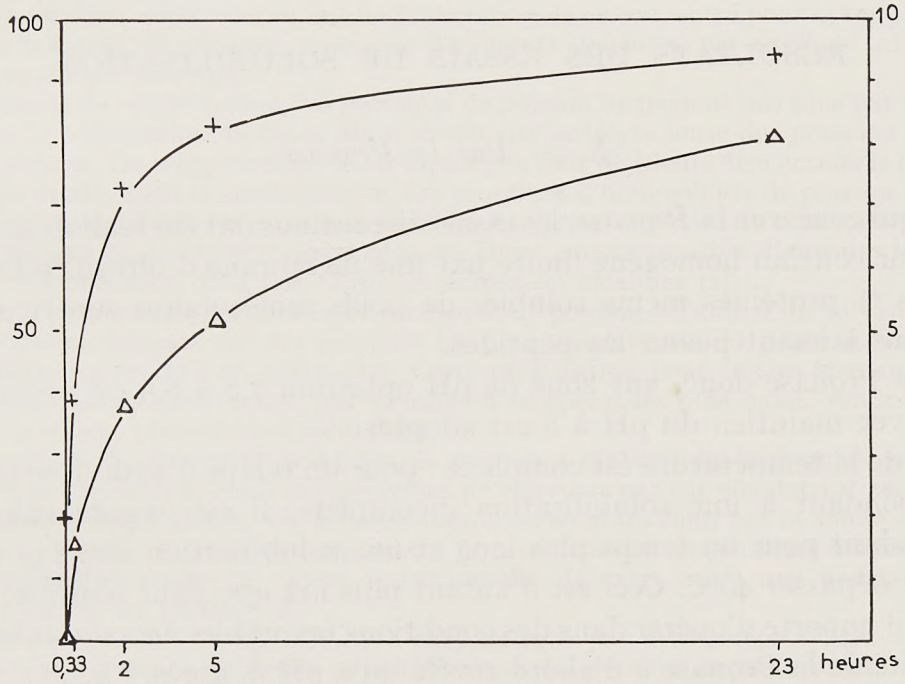


Fig. 1. — *Solubilisation du concentré protéique de poisson par la pronase*
+———+ % de solubilisation de l'azote
△———△ ml NaOH (N) ajoutés par 5 g de concentré protéique

La répartition des poids moléculaires des peptides solubilisés a été étudiée par chromatographie sur gel. La figure 2 montre que tout au long de la réaction, les peptides solubles formés sont presque tous de poids moléculaire inférieur à 2 000. Une quantité importante d'acides aminés libres semble apparaître, surtout pour les temps d'hydrolyse longs. Les 3 courbes correspondent de bas en haut, à 20 minutes, 2 heures et 23 heures d'hydrolyse. La solubilisation correspond donc à une protéolyse poussée. Des expériences d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'agent dis-

persant ont montré que les chaînes protéiques des enzymes de la Pronase sont de poids moléculaires égaux ou supérieurs à 19 000 et 35 000. Il est donc vraisemblable qu'il sera possible de séparer enzymes et peptides solubles par ultrafiltration.

La fraction insoluble en fin de réaction a été centrifugée et analysée. Elle contient les 2/3 des sels minéraux présents dans l'hydrolysat. La fraction soluble a été séchée par atomisation et sa valeur nutritionnelle déterminée sur des rats. Le rapport d'efficacité protéique est égal à celui du concentré protéique de poisson initial. Les peptides déshydratés sont instantanément solubles et présentent des caractères organoleptiques acceptables.

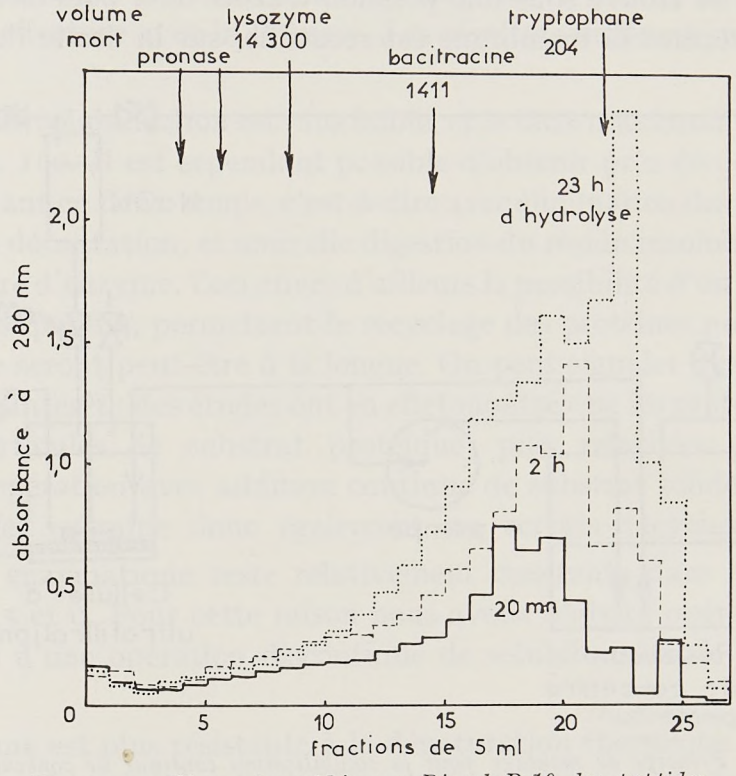


FIG. 2. — *Chromatographie sur Biogel P 10 des peptides résultant de l'hydrolyse du concentré protéique par la pronase*

Nous avons alors recherché une membrane d'ultrafiltration permettant la rétention des enzymes de la Pronase et le passage des peptides solubles. Diverses membranes d'acétate de cellulose ou de polymères synthétiques ont été essayées. L'une d'elles, *Amicon Diaflo* PM 10, permet de retenir 100 p. 100 de l'activité enzymatique résiduelle d'un hydrolysat de concentré protéique et laisse passer 77 p. 100 de l'azote solubilisé par la protéolyse (dans cet hydrolysat, 83 p. 100 de l'azote du concentré protéique avait été solubilisé). Une évaluation des poids moléculaires par chromatographie sur gel a montré que les peptides et protéines de poids moléculaires supérieurs à 2-3 000 sont entièrement retenus. Les peptides de poids moléculaires 500 à 2 000 sont partiellement retenus. Les composés de poids moléculaires plus faibles traversent librement la membrane. Indiquons encore que les produits de la réaction qui inhibent la réaction ne sont pas retenus par la membrane (6).

On peut se demander si lors d'un procédé continu, les protéines de poisson retenues par la membrane finiraient par être digérées ou au contraire s'accumuleraient

peu à peu dans le réacteur, ralentissant le flux à travers la membrane et rendant nécessaire un nettoyage périodique.

En vue de répondre à cette question, ainsi que pour évaluer la stabilité des enzymes lors d'une opération continue, un dispositif permettant une telle opération continue a été construit : la figure 3 en montre les éléments principaux.

Sur la gauche, la suspension de concentré protéique est placée dans un réservoir et la sédimentation est empêchée en faisant circuler cette suspension avec une pompe centrifuge. De ce réservoir la suspension pénètre en continu dans le réacteur à membrane d'ultrafiltration, où se trouve l'enzyme. Le mélange réactif est agité et thermostaté à 34°C. La régulation de pH est délicate parce que tout le circuit en amont de la membrane se trouve sous une pression d'azote de 4 bars environ. La solution de peptides traversant la membrane est recueillie, sur la droite du schéma.

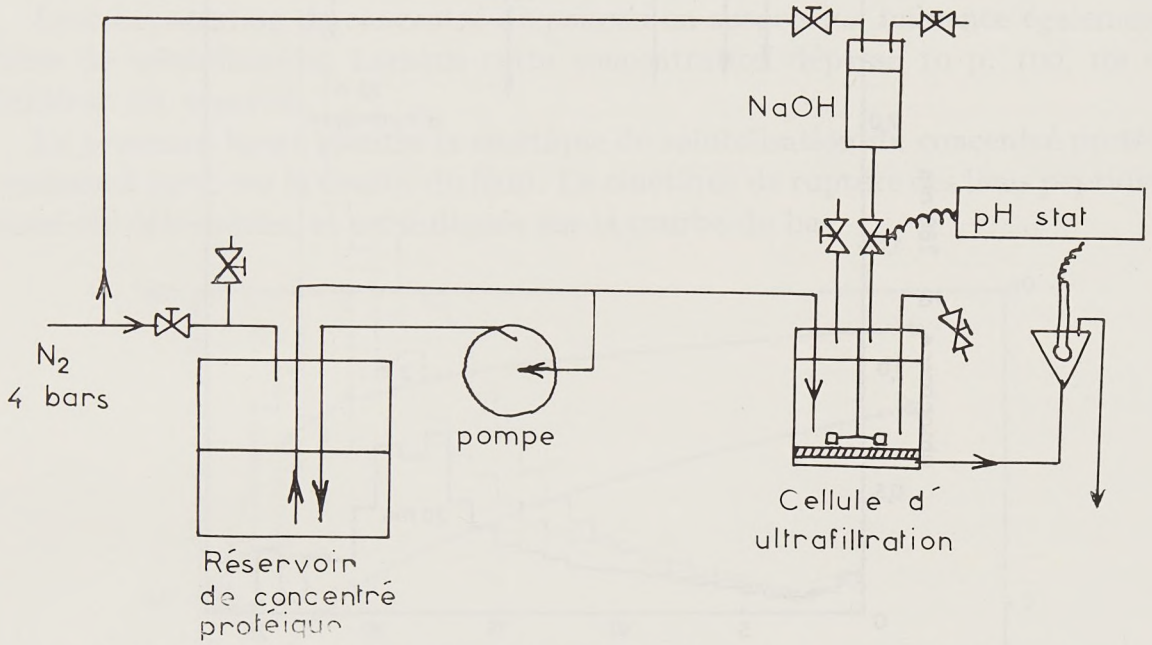


FIG. 3. — *Principe de montage pour la solubilisation continue de concentré protéique de poisson par la pronase*

Ce système a fonctionné en continu pendant 4 jours, avec un flux relativement constant (de l'ordre de 1 ml/mn, pour une surface de membrane de 45 cm^2 environ). Les bilans obtenus ne sont cependant pas significatifs, pour deux raisons ; d'une part le système était mécaniquement instable, du point de vue pH et concentration de la suspension entrante de concentré protéique. D'autre part, plusieurs expériences ont été interrompues par un développement bactérien, par exemple à pH 8,5, 34°C et sous azote. On peut faire remarquer que la membrane d'ultrafiltration recycle malheureusement aussi les bactéries!

Avant de décrire le procédé de solubilisation par la Monzyme, sans réutilisation de l'enzyme, procédé qui lui s'est révélé applicable en pratique, je voudrais dire que la réutilisation, au moins partielle, d'enzymes par ultrafiltration reste une possibilité souvent intéressante, étant donné le faible coût des opérations d'ultrafiltration. Nous avons par exemple mis au point à Montpellier un procédé continu d'hydrolyse de solutions concentrées de saccharose par de l'invertase. L'enzyme a été recyclée pendant plusieurs jours sans aucune perte d'activité. Il faut indiquer par ailleurs

que la récupération des enzymes peut se faire dans un second temps, la réaction enzymatique elle-même se faisant alors dans un réacteur normal, à la pression atmosphérique.

Le procédé de solubilisation continue du concentré protéique de poisson qui a été mis au point jusqu'à l'échelle de l'atelier pilote utilise les protéases de *Bacillus subtilis*, sans les recycler. Ces protéases se retrouvent donc dans le produit (où elles peuvent éventuellement être inactivées par pasteurisation).

B. — *Par la Monzyme*

L'étude préliminaire de solubilisation discontinue par la *Monzyme* est très semblable à celle effectuée avec la Pronase. Les résultats diffèrent sur les trois points suivants :

1) la vitesse de solubilisation est plus faible, et le taux maximum de solubilisation n'est que de 83 p. 100. Il est cependant possible d'obtenir près de 90 p. 100 de solubilisation, en opérant en deux temps, c'est-à-dire avec élimination des peptides solubles inhibiteurs, après décantation, et nouvelle digestion du résidu insoluble par une quantité supplémentaire d'enzyme. Ceci ouvre d'ailleurs la possibilité d'un réacteur continu limité par un filtre poreux, permettant le recyclage des protéines non encore solubilisées, mais qui le seront peut-être à la longue. On peut signaler que ce procédé présenterait un autre intérêt : des études ont en effet montré que les protéases sont adsorbées sur les particules de substrat protéique, puis relachées au cours de la protéolyse. Une opération avec addition continue de substrat solide et rétention des matières insolubles entraîne donc également un certain recyclage des enzymes.

2) l'activité enzymatique reste relativement constante dans une zone de pH comprise entre 6,5 et 9. Pour cette raison nous avons d'abord opéré sans régulation de pH. Au cours d'une opération discontinue de solubilisation, le pH varie de 7,3 à 6,5.

3) la Monzyme est plus résistante à la dénaturation thermique et à l'autodigestion que la Pronase. L'activité et la stabilité de l'enzyme au cours de la solubilisation ont été étudiées à diverses températures. A 34°C il n'y a pratiquement pas de perte d'activité enzymatique. Ceci indique bien l'effet protecteur du concentré protéique, car en solution dans de l'eau, la Monzyme s'autodigère même à 5°C. Dans les conditions expérimentales choisies (rapport pondéral enzyme/substrat = 1 p. 100, temps de protéolyse de 2 à 6 heures), une température de 50°C semble optimale. Lorsqu'une proportion plus faible d'enzyme et un temps de protéolyse plus long sont choisis, une température inférieure est préférable. Ces variations s'expliquent par un équilibre complexe entre l'augmentation de la vitesse de réaction et l'augmentation de la vitesse d'inactivation de l'enzyme sous l'effet de la température. Dans un procédé continu sans recyclage d'enzyme, il n'est pas nécessaire d'éviter la dégradation partielle de l'enzyme au cours de la réaction. Il n'est cependant pas possible ici d'opérer à plus de 60°C.

Un tel procédé continu a été mis au point. La figure 4 montre le système utilisé. Une suspension aqueuse de concentré protéique (à 10 p. 100) est maintenue agitée dans un réservoir à une température excluant tout développement bactérien. Elle est introduite de façon continue, à un débit constant (correspondant à 25 g de concen-

tré par heure), dans un réacteur homogène agité, à l'aide d'une pompe péristaltique. Une solution d'enzyme est également introduite, de façon continue, dans le même réacteur. Par la suite un appareil permettant l'addition continue de poudres a été utilisé, un mélange solide enzyme/substrat de proportion désirée, généralement

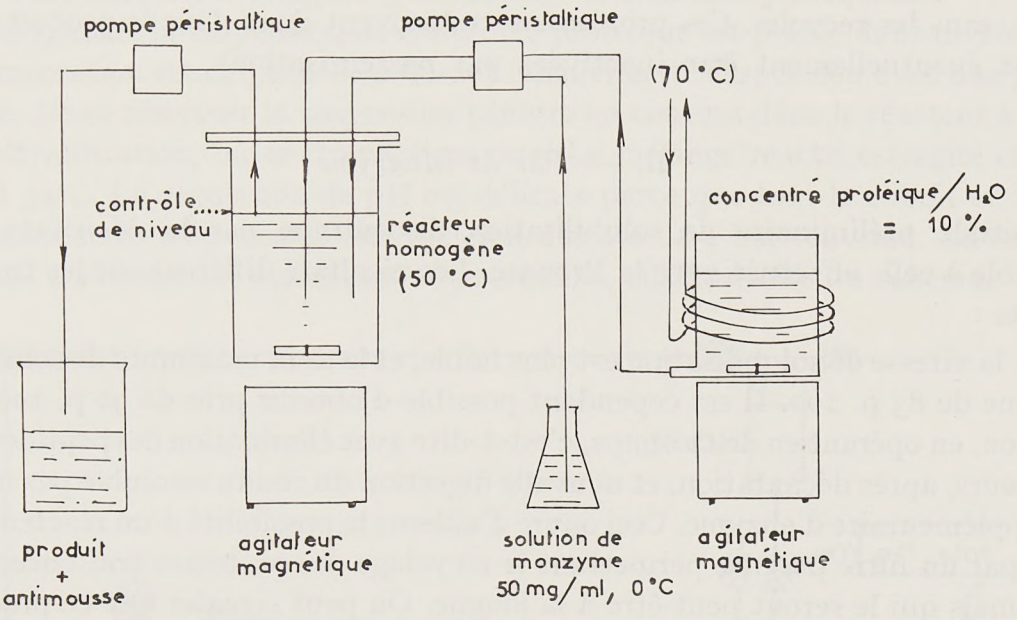


FIG. 4. — *Principe de montage pour la solubilisation continue de concentré protéique de poisson par la monzyme*

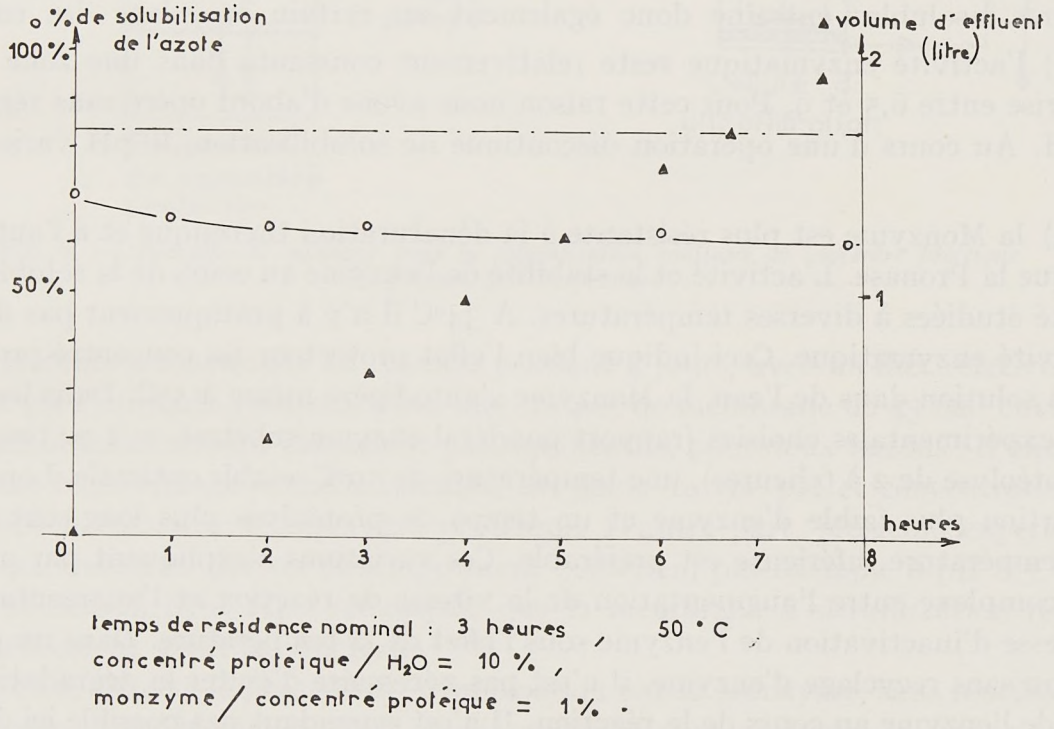


FIG. 5. — *Solubilisation continue du concentré protéique de poisson par la monzyme*

1 p. 100, étant préparé préalablement. Le mélange réactionnel est évacué du réacteur, de façon continue, à l'aide d'un trop plein relié à une pompe.

La figure 5 montre la variation du taux de solubilisation au cours d'une opéra-

tion continue effectuée à 50°C et avec un temps de résidence nominal de 3 heures. (Le temps de résidence nominal est par définition le rapport volume du réacteur/ débit). Au temps 0, un hydrolysat contenant 70 p. 100 de son azote sous forme soluble, et obtenu de façon discontinue, a été placé dans le réacteur. Un équilibre du taux de solubilisation semble être atteint, après 8 heures d'opération continue, à une valeur proche de 62 p. 100. Dans un procédé discontinu, un temps de résidence de 3 heures aurait donné une solubilisation de 72 p. 100 de l'azote. Qu'il existe une différence de rendement entre les deux procédés n'est pas étonnant puisque les particules de substrat séjournent pendant des durées diverses dans un réacteur continu homogène.

Nous avons alors essayé de prévoir de façon très approximative le taux de solubilisation à l'équilibre, en fonction du temps de résidence nominal dans le réacteur. Le pourcentage de probabilité pour une particule de substrat d'être sortie du réacteur dès un temps t après son entrée est facilement calculable. Par exemple, après un temps t égal au temps de résidence nominal, 63 p. 100 des particules introduites au temps 0 sont déjà sorties. On peut ainsi calculer, pour chaque temps de résidence nominal, la distribution des temps de résidence réels des particules : une fraction donnée des particules séjournera dans le réacteur de 0 à 15 minutes, une autre fraction de 15 à 30 minutes etc. Sachant d'après les essais discontinus de solubilisation que l'azote d'une particule restant 0 à 15 minutes en contact avec l'enzyme sera solubilisée à environ 25 p. 100, et à 35 p. 100 si le contact est de 15 à 30 minutes, etc., on calcule alors le taux de solubilisation global à l'équilibre en faisant une moyenne pondérée.

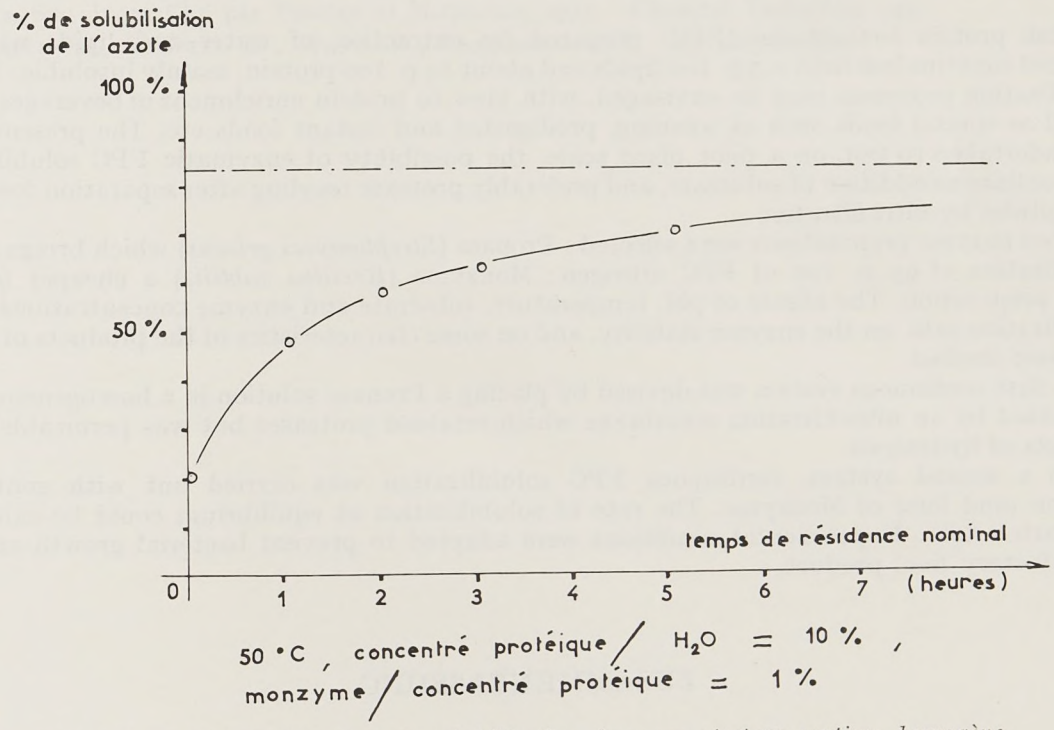


FIG. 6. — *Courbe théorique de solubilisation dans un réacteur continu homogène*

La figure 6 montre la courbe obtenue par ce calcul. Il y a accord avec la valeur expérimentale pour un temps de résidence de 3 heures. Cet accord peut cependant n'être qu'une coïncidence ; en effet ce calcul approximatif n'est justifié que si la réaction de solubilisation suit globalement une cinétique de premier ordre par rapport

à la concentration en azote insoluble, ce qui n'est pas tout à fait le cas. La figure montre par ailleurs qu'il est peu avantageux d'opérer avec un temps de résidence très long.

Certaines expériences prolongées de solubilisation continue ont révélé un développement bactérien, probablement dû au *Bacillus stearothermophilus* (et non au *Bacillus subtilis*). Nous avons essayé d'empêcher ce développement en augmentant température et concentration en enzyme, tout en réduisant le temps de résidence nominal à 2 heures. En effet si le renouvellement du volume du réacteur est plus rapide que le taux de croissance des bactéries, tout contaminant éventuel doit être chassé. Il n'en a pas été ainsi, et ce n'est qu'en effectuant une régulation du pH à 9 que la croissance bactérienne a pu être évitée. Une température de 50°-60°C a été adoptée, avec un temps de résidence de 2 ou 3 heures (7).

Ce procédé de solubilisation est actuellement utilisé à l'échelle de l'atelier pilote en vue de la préparation de quantités de peptides solubles suffisantes pour effectuer une évaluation de leurs propriétés nutritionnelles, organoleptiques et fonctionnelles. L'optimisation des autres étapes du traitement, entre autres centrifugation et déshydratation, est aussi poursuivie.

SUMMARY

CONTINUOUS ENZYMATIC SOLUBILIZATION OF FISH PROTEIN CONCENTRATE. ENZYME RECYCLING STUDIES

Fish protein concentrate (FPC) prepared by extraction of water and lipids with *iso*-propanol contains less than 0.5 p. 100 lipids and about 85 p. 100 protein, mainly insoluble. Various solubilization processus may be envisaged, with view to protein enrichment of beverages, soups, as well as special foods such as weaning, predigested and instant foods etc. The present study was undertaken to test, on a pilot plant scale, the possibility of enzymatic FPC solubilization with continuous addition of substrate, and preferably protease recyling after separation from soluble peptides by ultrafiltration.

Two enzyme preparations were selected ; Pronase (*Streptomyces griseus*) which brings a rapid solubilization of 95 p. 100 of FPC nitrogen ; Monzyme (*Bacillus subtilis*) a cheaper but less active preparation. The effects of pH, temperature, substrate and enzyme concentrations on the solubilization rate, on the enzyme stability, and on some characteristics of the products of hydrolysis were studied.

A first continuous system was devised by placing a Pronase solution in a homogeneous reactor limited by an ultrafiltration membrane which retained proteases but was permeable to the products of hydrolysis.

In a second system, continuous FPC solubilization was carried out with continuous addition (and loss) of Monzyme. The rate of solubilization at equilibrium could be calculated from batch data. Experimental conditions were adapted to prevent bacterial growth and give a satisfactory final product.

ZUSAMMENFASSUNG

ENZYMATISCHE, KONTINUIERLICHE LÖSLICHKEIT VON FISCHKONZENTRATEN

Das durch Wasser-und Fettentzug mit Hilfe von *Iso*-propanol gewonnene Proteinkonzentra von Fischen enthält weniger als 0,5 p. 100 von Fetten und ungefähr 85 p. 100 Eiweiss-Stoffe, diet praktisch unlöslich sind. Verschiedene Verfahren für Solubilisierung können eingesetzt werden mit dem Ziel, eine Anreicherung von Getränken, Suppen und Spezialgerichten wie z.B. Kindernährmittel, kochfertig, sofort löslich, usw. mit Proteinen zu erreichen. Die hier vorgeführten

Untersuchungen wurden angestellt um zu erfahren, ob es möglich ist, im halbindustriellen Masstab eine enzymatische Proteolyse zur Solubilisierung einzusetzen, mit kontinuierlicher Zusetzung von Substrat und, wenn möglich, mit Abtrennung der Spaltungsprodukte und der Enzyme durch Ultrafiltration zwecks Wiederbenutzung der Letzteren.

Zwei Enzympräparationen wurden untersucht : die Pronase (*Streptomyces griseus*), die eine schnelle Solubilisierung von 95 p. 100 der Stinkstoffbestandteile erlaubt. Das Monzym (*Bacillus Subtilis*), eine wesentlich billigere, aber auch weniger aktive Präparation. Die Wirkungen von pH, Temperatur, der Substrat-und Enzymkonzentration auf die Solubilisierungs-geschwindigkeit, auf die Stabilität der Enzyme und auf gewisse Eigenschaften der Spaltungsprodukte wurden untersucht.

Ein erstes kontinuierliches System wurde ausgearbeitet, in dem eine Pronase-Lösung in einen homogenen, mit einer Ultrafiltrationsmembran begrenzten Behälter gegeben wird, der die Proteasen zurückhält, jedoch für die Spaltprodukte durchlässig ist.

Ein zweites System erlaubt eine kontinuierliche Solubilisierung des Eiweisskonzentrates mit Zusatz von Monzym, das aber verloren geht. Der Solubilisierungsgrad, im Gleichgewichtszustand, ist errechnet worden aus Ergebnissen, die von nicht-kontinuierlichen Versuchen stammen. Die angewandten Operationsbedingungen verhindern ein Bakterienwachstum und führen zu einem annehmbaren Endprodukt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Cheftel C., Ahern M., Wang D., Tannenbaum S., 1971. *Agr. Food. Chem.*, **19**, 155.

(2) Finch R., 1970. *Critical Review of Food Technology*, **1**, 519.

(3) Tannenbaum S., Ahern M., Bates R., 1970. *Food Technology*, **24**, 96.

(4) Hale M., 1969. *Food Technology*, **23**, 107.

(5) Keay L., Moser P., Wildi B., 1970. *Biotechnology and Bioengineering*, **12**, 179 et 213.

(6) Cheftel C., Tannenbaum S., Wang D., 1970. *Congrès de l'American Institute of Chemical Engineers*. San Juan. Cité par Porter et Michaels, 1971. *Chemical Technology* 440.

(7) Archer M., Cheftel C., Wang D., Tannenbaum S. En préparation.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 435-455.

ENZYMOLOGISCHE UND CYTOLOGISCHE PROBLEME DER KAKAOAUFBEREITUNG

B. BIEHL

Botanisches Institut, Tierärztliche Hochschule,
Bünteweg 17,3 - Hannover-Kirchrode (BRD) [1]

ZUSAMMENFASSUNG

Die angestrebten Veränderungen in den Kakaosamen während der Fermentation werden zwar durch die mikrobielle Gärung des Fruchtfleisches ausgelöst und beeinflusst, sie sind aber direkte Folge von Umsetzungen in den Kotyledonen, die durch die eigenen Enzyme der Samen katalysiert werden. Für die Entwicklung des Schokoladenaromas beim Rösten ist eine vorangehende Fermentation erforderlich. Darauf beruht die heutige Vorstellung von der chemischen Bildung spezieller Aromaprecursoren bei der Fermentation.

Die ausnahmslos chemischen Untersuchungen zu dieser Frage haben solche speziellen Precursoren bisher nicht direkt belegt. Sie sind noch hypothetisch. Zytologische Aspekte fanden bisher wenig Aufmerksamkeit. In diesem Vortrag wird der Gesichtspunkt dargestellt, dass die bisher nur ungenügend erfasste Veränderung der Zellstruktur eine wesentlich ausgeprägtere Bedeutung für die Rohkakaoqualität und die spätere Aromaentwicklung hat, als bisher angenommen wurde. Die postmortale Veränderung der Feinstruktur wird durch lytisch enzymatische Prozesse ausgelöst. Dabei kommt es zur Freisetzung von Zucker und Aminosäuren, welche allgemein beim Rösten und nachweislich im Kakao Aroma liefern.

Nach einer gerafften Darstellung der « äusseren » und « inneren » Kakaofermentation werden die auffälligsten enzymatischen Reaktionen, die Proteinhydrolyse und die Glykolyse behandelt. Gleichzeitig kommt es zur Proteingerbung : durch Tanningerbung in der anaeroben Phase, durch Chinongerbung in der folgenden aeroben Fermentationsphase.

Es werden Experimente besprochen, welche zeigen, dass die durch Polyphenoloxydase ausgelöste Chinongerbung im Gegensatz zur Tanningerbung die Proteinhydrolyse vollständig unterbindet, wenn der Zellaufschluss ohne anaerobe Phase sofort unter aeroben Bedingungen erfolgt.

In der postmortalen anaeroben Phase müssen darum die wichtigsten lytischen Prozesse abgeschlossen werden.

An Hand elektronenoptischer Aufnahmen wird die Feinstruktur der zwei Zelltypen der Kotyledonen in Einzelheiten dargestellt. Entgegen der bisherigen Annahme lassen sich Plasma und somit Enzyme in den Polyphenolzellen nachweisen. Wichtiger als die blosse Durchmischung der Inhalte der Polyphenol-Vakuolen mit dem Inhalt der parenchymatischen Speicherzellen dürfte die Auflösung der Feinstruktur sein (Freisetzung der Proteine aus den Aleuron-Vakuolen der Enzyme aus Sphaerosom-Vesikeln, Amyloplasten und Mitochondrien). Die postmortalen Bedingungen in wässriger Phase ermöglichen das. Die Auflösung der Mittellamelle, der Mitochondrien und Aleuronvakuolen nach dem Absterben der Zelle in der anaeroben Fermentationsphase kann nachgewiesen werden. Danach kommt es zum Verfliessen der zahlreichen, ursprünglich isolierten Lipid-Vakuolen.

[1] neue Anschrift : Botanisches Institut, Technische Universität, Humboldtstrasse 1, Braunschweig (BRD).

Schon während der Fermentation kommt es zu dem wichtigen Übergang :

isoliert Lipidvakuolen in kontinuierlicher, wässriger Phase des Plasmas → isolierte hydrophile Einschlüsse in kontinuierlicher Lipidphase.

Sind bis dahin die Enzyme und ihre Substrate aus ihren (getrennten) Kompartimenten nicht freigesetzt und die wasserlöslichen Reaktionspartner nicht molekular gemischt, so bleiben sie bei der Röstung in den trockenen Kakaobohnen durch die Lipidphase getrennt, ohne miteinnder reagieren zu können. Die Grösse der plasmatischen Kompartimente einerseits und der Korngrösse in der Schokoladenmasse andererseits lassen eine spätere Durchmischung während der Verarbeitung ausgeschlossen erscheinen.

EINLEITUNG

Die Kakaofermentation ist kein industrieller Prozess. Sie ist ein Verfahren der tropischen Produktionsländer, bei dem die Kakaosamen in ein trockenes, lagerstabiles Handelsprodukt überführt werden. Erst beim Rösten in der Schokoladenfabrik wird hieraus das charakteristische Schokoladenaroma entwickelt. Die Kakaofermentation ist aber für die Schokoladenindustrie von ausschlaggebender Bedeutung, denn ohne Fermentation wird kein typisches Schokoladenaroma entwickelt (Abb. 1).

ROHKAKAO (fermentiert) —rösten (*110-140*°C)→ Schokoladenaroma

getrocknete KAKAOSAMEN (unfermenteirt) —rösten (*110-140*°C)→ kein Aroma

Abb. 1.

Welches Prinzip bei der Fermentation führt zur Aromabildung beim Rösten ?

Der Prozess wird im Wesentlichen durch eine alkoholische Vergärung des Fruchtfleisches durch Hefen bestimmt. In diesem Fruchtmus sind die Kakaosamen während der Fermentation eingebettet. Die Umsetzungen der Mikroorganismen sind nicht direkt für die Entwicklung des eigentlichen Schokoladenaromas verantwortlich. Möglicherweise gehen Nebenkomponenten des Aromas aus Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen hervor. Das eigentliche Schokoladenaroma und seine Vorläufer entstehen allein in den Samen. Es lässt sich experimentell auch ohne Fruchtfleischgärung durch Wirkung der eigenen Enzyme der Kotyledonen bilden. Die Fruchtfleischvergärung löst aber die Vorgänge in den Samen aus und bestimmt die Bedingungen der Umsetzungen in den Samen. Die Fruchtfleischgärung hat somit keinen direkten, wohl aber einen wesentlichen indirekten Einfluss auf die Aromaentwicklung.

Man kann demnach unterscheiden :

a) die « äussere » Fermentation ; das ist der mikrobielle Abbau des Fruchtfleisches (Pulpa) und

b) die « innere » Fermentation ; das sind die eigentlichen Veränderungen in den Samen selbst. Es ist ein postmortaler Prozess in den Samen, aber ausgelöst und in den Bedingungen bestimmt durch die « äussere » Fermentation.

Die « äussere » Fermentation beginnt zunächst mit einer alkoholischen Gärung in der dicht gepackten Fruchtfleischmasse, welche Zucker, Schleime und Säuren enthält. Aufgrund der CO_2-Entwicklung herrschen anaerobe Verhältnisse. Mit Abbau der Pulpa und zunehmender Belüftung kommt es zur anschliessenden Essigsäuregärung. Dabei bleiben jedoch anaerobe Verhältnisse in den Samen bestehen bis fast zum Fermentations ende nach etwa 5-7 Tagen hin. Die Essigsäurebildung sorgt jedoch für einen starken Temperaturanstieg bis zu 52°C. Durch diese Erhitzung und die eindringende Essigsäure sterben die Samen ab. Der « Aufschluss » der Zellen ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Abfall des pH in den Samen. Nach vollständigem Abbau des Fruchtfleisches am Ende der Fermentation steigt der pH wieder rasch auf 6-7 an.

Bei der « inneren » Fermentation sterben die Samen aufgrund des Temperaturanstieges ab, und es wird dadurch in saurem Milieu ein postmortaler Prozess unter anaeroben Bedingungen eingeleitet. Der phenolische und durch Anthocyane rotgefärbte Inhalt der Zellsaftvakuolen tritt nicht nur aus den Zellen aus, sondern auch durch die Samenschale hindurch. Es kommt nun zu enzymatischen Hydrolysen. Die stärkere Belüftung der Masse am Ende der Fermentation, welche durch einen Hitzeauftrieb gefördert wird, leitet Umsetzungen in der folgenden aeroben Phase der Fermentation ein. Es sind enzymatische Bräunungen. Die eigentliche aerobe Phase der Umsetzungen ist die Trocknung der Kakaobohnen auf flachen Böden an freier Luft. Im allgemeinen ist bei der Fermentation also die Reihenfolge :

Aufschluss der Zellen (Absterben) —— anaerobe, lytische Phase —— aerobe (Bräunungs-) Phase. gegeben.

Abb. 2 veranschaulicht die Vorgänge nochmals im Zusammenhang. Dabei bedeuten die verschiedenen Kästen lediglich verschiedene Stadien einer Fermentation in ein und demselben Behälter.

Der Ablauf der Fruchtfleischvergärung, welcher unter den Bedingungen in den Tropen in der Hand des Pflanzers unterschiedlich sein kann, ist für die Qualität des Kakaos von Bedeutung (40). Dieser soll hier nicht dargestellt werden, sondern vielmehr die enzymatischen Prozesse innerhalb der Kotyledonen : Welche enzymatischen Reaktionen laufen ab, welche mögliche Bedeutung haben sie für die Aromabildung ? Hier sollen nicht allein die chemischen Reaktionen dargestellt werden. Vielmehr soll diskutiert und an Hand von ersten elektronen-optischen Befunden erhärtet werden, dass die Veränderungen der Feinstruktur in den Kotyledonenzellen ein interessanter Aspekt im Zusammenhang der enzymatischen Umwandlungen ist, der bisher wenig berücksichtigt wurde und wahrscheinlich erhebliche praktische Bedeutung hat.

Das Aroma wird, wie gesagt, beim Rösten entwickelt, aber nur, wenn vorher eine Fermentation erfolgte. Daraus hat sich eine Hypothese entwickelt, dass im Verlaufe der Fermentation auf chemischem Wege Aromaprecursoren gebildet werden. Diese allgemein vertretene Annahme darf nicht darüber hinwegtäuschen, dass weder die eigentlichen Aromastoffe noch ihre Vorstufen bekannt sind. Die neueren direkten

Aromaanalysen haben mit Hilfe der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie zahlreiche — bis zu 303 (1) — Aromakomponenten nachgewiesen. Es ist daraus aber nicht abzuleiten, welche am eigentlichen Schokoladen aroma beteiligt sind und aus welchen Vorstufen sie sich bilden (2, 3, 4 und andere).

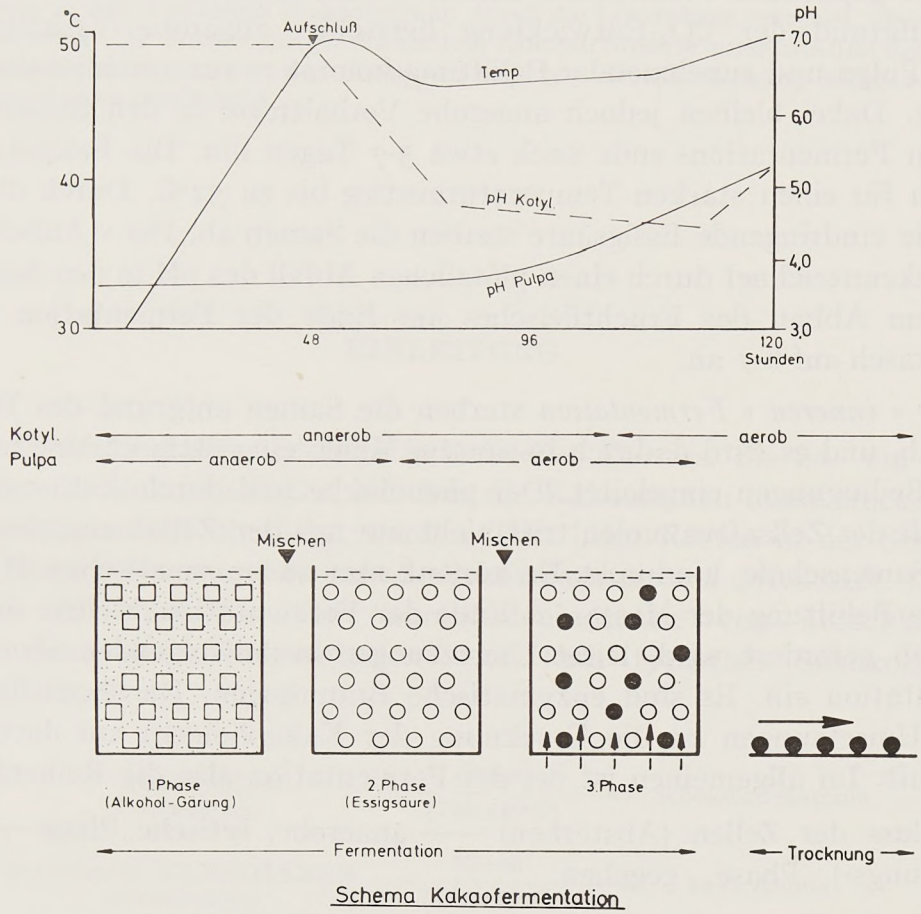


Abb. 2. — *Schema einer Kastenfermentation und Verlauf der Temperatur — und pH-Kurven, Aufschluss der Zellen und Gaswechsel* (CO_2/Luft). *Die drei Kästen symbolisieren verschiedene Stadien einer einzigen Fermentation*

□ = unfermentierte Samen
○ = Samen in der anaeroben hydrolytischen Phase
● = Samen in der aeroben Bräunungsphase
⟶ = Luftstrom

UMSETZUNGEN IN DER ANAEROBEN PHASE

Aus der Gesamtanalyse der Kakaosamen ergibt sich (vergl. Ubersichtsberichte 5-9) : Fette, Stärke und Purinalkaloide, welche bei der Keimung erheblich metabolisiert werden (10), bleiben während der Fermentation offensichtlich unverändert. Die eigentlichen Veränderungen werden in den Gruppen der *Polyhydroxyphenole*, der *Proteine* und der *Zucker* gefunden.

Im lichtmikroskopischen Bild lassen sich zwei Zellen im Kotyledonengewebe unterscheiden : Isodiametrische Parenchymzellen enthalten keine Zellsaftvakuolen, jedoch viele Fett- und Protein einschlüsse. Daneben sind etwas grössere Zellen mit einer grossen gefärbten Vakuole zu erkennen. In nichtwässrigen Medien nach Gefrier-

trocknung hat Brown (1954 (12)) experimentell beide Zelltypen voneinander getrennt und gefunden, dass die Parenchymzellen die Fette und Protein (und somit Enzyme) aber keine Purine oder Polyhydroxyphenole enthalten, die Idioblasten hingegen nur Polyhydroxyphenole und Purine aber keine Fette und keine Proteine. Enzymatische Veränderungen der Polyphenole setzen also eine Fusion der Inhalte beider Zelltypen voraus.

DIE POLYHYDROXYPHENOLE UND IHRE UMWANDLUNGEN

Früher neigte man zu der Annahme, dass die Polyphenole für die Qualität des Kakaos und sein Aroma den Ausschlag geben. Der hohe Flavonoidgehalt charakterisiert neben den Purinbasen den Kakao. Demzufolge wurden gerade diese Stoffe besonders untersucht.

Abb 3 : 30 Gewichtsprozent der fettfreien Trockenmasse bestehen aus Polyphenolen. Es sind fast ausschliesslich Flavonoide und nur Spuren von Phenylpro-

Polyhydroxyphenole der Kotyledonen der Kakaosamen	
Catechine :	37 %
(—) Epigallocatechin, (—) Gallocatechin, (—) Epicatechin, (—) Catechin	
Anthocyanine :	4 %
Cyanidin 3-Galactosid, Cyanidin 3-Arabinosid	
Proanthocyanidine (Leucoanthocyanidine) *:*	58 %
L_1 (Dimer), L_2 (Stereoisomer von L_1?), L_3, L_4 (komplexe Leucoanthocyanidine, Tetra- und Heptamere von L_1? glycosidisch?)	
Chlorogensäure :	Spur
p-Cumarylchinasäure :	Spur

Abb. 3.
(aus Forsyth und Quesnel (8) und Quesnel (15)

panen. Die auffälligste Komponente sind die Anthocyanidine, welche als Glycoside des Cyanidins vorliegen und die violette Färbung des unfermentierten Konsumkakaos verursachen. Das Verschwinden der violetten Farbe wird indirekt mit der Qualität in Zusammenhang gebracht.

Die Hauptmenge wird gebildet von Catechinen und Leucoanthocyanidinen, welche als Monomere wirksame Gerbstoffe sind. Tatsächlich aber können nur die Leucoanthocyanidine gerbend wirken, weil nur sie dimer oder oligomer vorliegen und so Gerbstoffeigenschaften besitzen. Nach der Freudenbergschen Schule handelt es sich hier also um dimere Proanthocyanidine (Erhitzen mit Säure führt zu Cyanidin), welche aus Catechinen kondensiert sind. Die Struktur von L_1-L_4 wurde von der Trinidad-Gruppe untersucht (13, 14,15). Sie enthalten glycosidisch Zucker.

Für die Vorgänge bei der Fermentation sind sicher folgende Eigenschaften der Flavonoide sehr wichtig :

1. Die grosse Menge der di- und oligomeren Proanthocyanidine stellen wirksame Tanningerbstoffe.

2. Zum grossen Teil liegen sie als Glykoside und somit wasserlöslich (in den Vakuolen) vor, aber auch die Aglykone der Gerbstoffe können durch Peptisation in Lösung gehalten werden. Sie können also in wässriger Phase leicht reagieren.
3. Sie haben alle ortho-ständige Dihydroxygruppierungen und sind damit zu Chinonen oxydierbar, die wiederum Folgereaktionen, insbesondere Kondensationen, eingehen.

Genauere Kenntnisse der Veränderungen der Polyphenole bei der Fermentation verdanken wir besonders FORSYTH (Trinidad, 1952) (16) und Mitarbeitern.

Umsetzungen beginnen nicht vor dem Zellaufschluss. In der anaeroben Phase werden die Polyphenole insgesamt vermindert, allerdings in unterschiedlichem Grade : Eine anfängliche Erhöhung der komplexen Leucoanthocyanidine führt FORSYTH auf die Bildung komplexer Leucoanthocyanidine aus Monomeren unter den anaeroben Bedingungen der Fermentation zurück. Die Verminderung der übrigen ist in erster Linie auf Exudation der Polyphenole mit dem Zellsaft der Polyphenolzellen durch die Samenschale (bis zu 40 p. 100) zurückzuführen. Dieser Verlust betrifft alle gelösten Komponenten. Enzymatischer Abbau wurde nur bei den Anthocyaninen gefunden. Glycosidasen spalten sie in Zucker und Aglykon. Dementsprechend steiler verläuft die Anthocyan-Abnahme.

In der aeroben Phase schliesst sich dann die enzymatisch induzierte Phenol-Oxydation und nichtenzymatische Kondensation der gebildeten Chinone zu Phlobaphenen an.

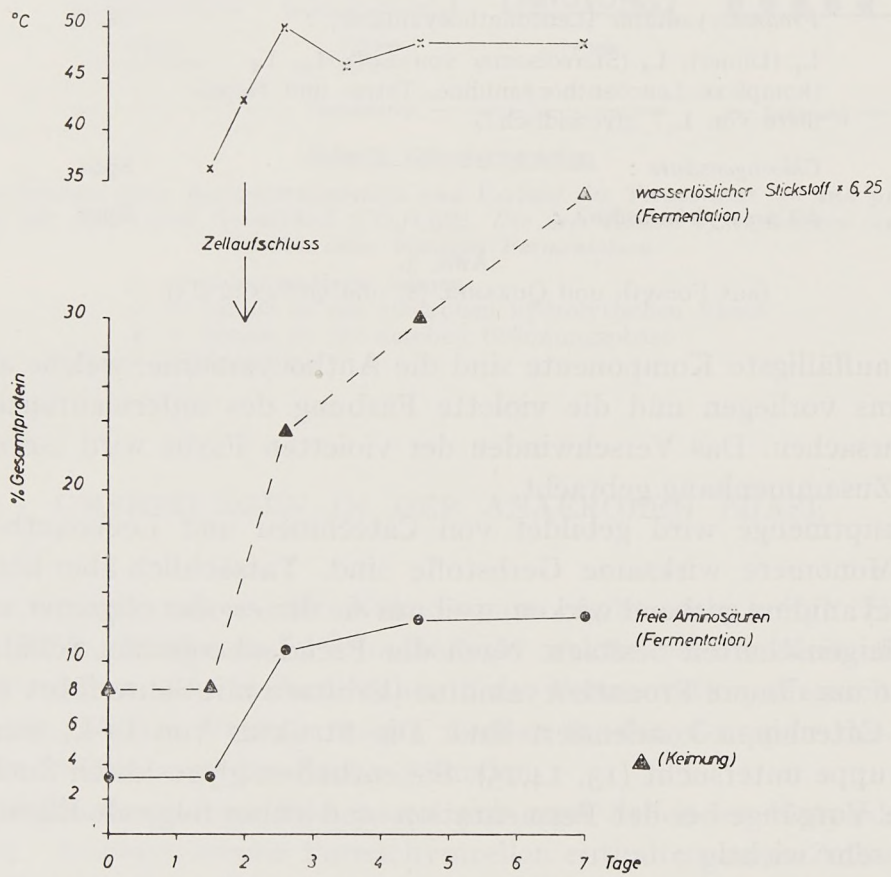


ABB. 4. — *Proteinhydrolyse während einer Kastenfermentation und bei der Keimung* (ohne Berücksichtigung der Exudate ber. n. Biehl (1958) (20))

Die für diese Reaktion verantwortlichen Enzyme sind in frischen Kakaosamen und während der Fermentation aktiv und von verschiedenen Autoren nachgewiesen worden (17). Es handelt sich offenbar um verschiedene β-Glycosidasen und mindestens eine Oxydase vom Typ der Phenolasen.

Auch die Disaccharide werden während der Fermentation enzymatisch hydrolysiert. Dabei nehmen die reduzierenden Zucker, also die Monosaccharide von 0,1 auf 1,0 p. 100 zu. Das ist bei einem Gesamtgehalt an Zucker von 2-3 p. 100 eine Hydrolyse von 30-50 p. 100 (18). Die wirksame Glucosidase wurde nachgewiesen (17).

Abb 4: Bereits Birch (41) wies durch Stickstoffanalysen 1941 eine Proteinhydrolyse während der Fermentation nach. Tatsächlich ist die enzymatische Hydrolyse der Proteine die stärkste enzymatische Umsetzung während der anaeroben Fermentation. Genauere Untersuchungen der einzelnen Aminosäuren (19) zeigen, dass alle Aminosäuren der Kakao proteine gleichermassen freigesetzt werden. Es ist also eine allgemeine Proteinhydrolyse. Das ergibt sich auch aus dem stärkeren Anstieg des wasserlöslichen Stickstoffs gegenüber dem freien Aminostickstoff (20).

Neben Aminosäuren werden demnach Peptide frei. Das zeigen auch die entsprechenden Chromatogramme. Bei der Keimung wird dagegen der Aminosäurespiegel nicht erhöht.

Auch bei den Proteinen setzt die Hydrolyse erst zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses (nach Erreichen von 45-52°C) ein (20). Es ist nachgewiesen worden, dass diese Hydrolyse enzymatisch ist (20,21).

ENZYME

Wegen der Bedeutung der eigenen Enzyme der Kotyledonen für diese Umsetzung sind Aktivitäten und Eigenschaften dieser und anderer Enzyme verschiedentlich untersucht worden. Ganz unabhängig ist grundsätzlich anzunehmen, dass alle Enzyme des Primärstoffwechsels in den Kakaosamen vorhanden und nachweisbar sind. Der Kakaosamen macht keine endogen bedingte Samenruhe durch. Es ist also zur Keimung keine Enzymaktivierung erforderlich.

Die hohe Aktivität der Polyphenoloxydase ergibt sich z.B. aus der spontanen Bräunung des verletzten Samengewebes.

In diesen Zusammenhang muss auch auf den Nachweis von Pektinase und Polygalakturonidase in Kakaosamen (17) hingewiesen werden. Sie ist für die strukturellen Veränderungen in den Samen von Interesse.

Abb 5 : Die Aktivität aller untersuchten Enzyme nimmt während der Fermentation ab, im allgemeinen bis zur völligen Inaktivierung. Das ist hier an den drei wichtigsten Enzymen von FORSYTH *et al.*, graphisch dargestellt worden (21). Allgemein setzt die Inaktivierung sofort mit dem Zellaufschluss ein, also beim Erreichen von 45-50°C in der Masse.

24-48 Stunden nach dem Aufschluss ist bei den meisten Enzymen keine Aktivität mehr nachweisbar (17). (Das gilt nachweislich für Amylase, β-Glycosidase, Catalase, Peroxydase und β-Glucosidase).

Erforderliche enzymatische Umsetzungen müssen also in diesem Zeitraum abgelaufen sein.

Die Phenolase wird während der Fermentation nicht vollständig inaktiviert. Etwa 2 p. 100 Restaktivität bleiben nach der Fermentation erhalten (siehe unten).

Für die Inaktivierung der Enzyme kommen zwei Ursachen in Frage :

1. Die allgemeine Proteinhydrolyse kann selbstverständlich auch Enzymprotein spalten.
2. Nach dem Zellaufschluss wird das Gewebe mit gerbwirksamen Proanthocyanidinen überschwemmt. Tatsächlich nehmen Forsyth *et al.* (21) Gerbungen als Ursache an.

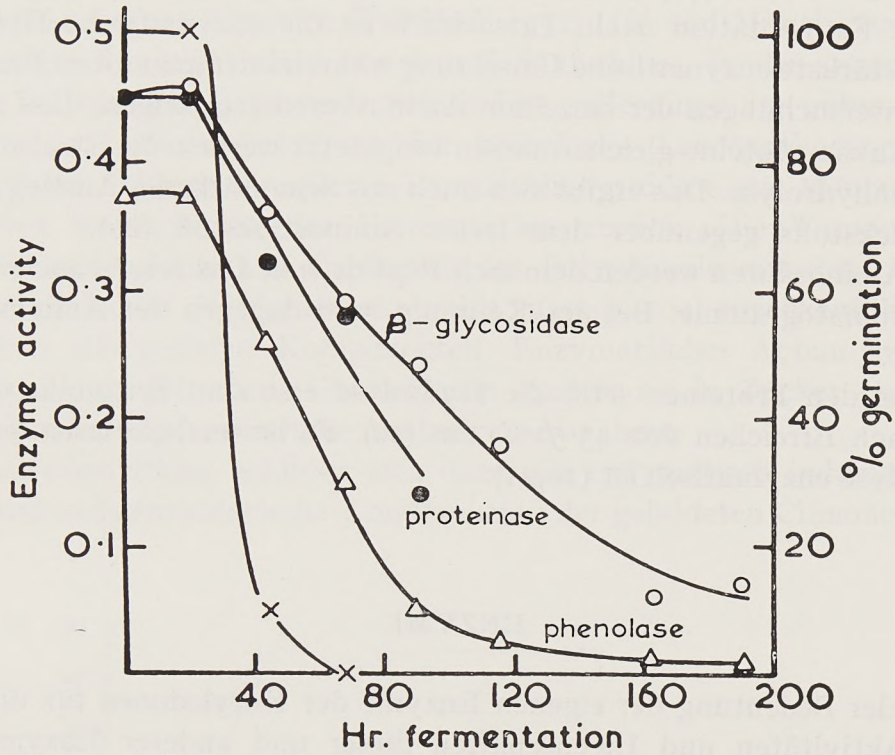


Abb. 5. — *Änderungen von Enzymaktivitäten in einer Kastenfermentation*
×——× : Keimfähigkeit
(nach Forsyth, Quesnel, Roberts (1968) (21))

Nach dem Aufschluss konkurrieren demnach also *a*) die enzymatische Hydrolyse und *b*) die Gerbung der Enzymproteine. *Abb.* 6 : Beide sind gleichermassen vom Zellaufschluss und der Durchmischung der Zellinhalte abhängig.

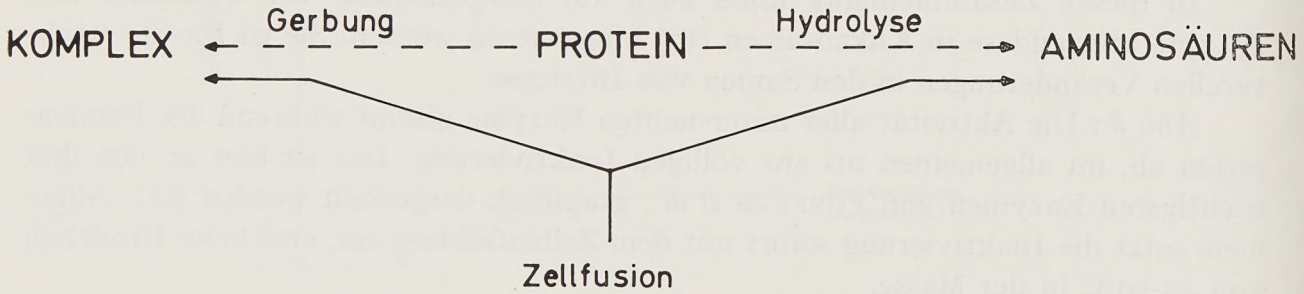


Abb. 6. — *Gleichzeitiger fördernder Einfluss der Zellfusion auf die Gerbung und auf die Hydrolyse der Proteine*

Es kann jedoch gezeigt werden, dass die Gerbung in der anaeroben Phase, die eigentliche Tanningerbung, nicht kritisch ist, sonst wäre eine Proteinhydrolyse auch nicht möglich. Kritisch ist dagegen die Gerbung in der aeroben Phase : Die Chinon-

gerbung nach Oxydation der Phenole. Das ergibt sich aus dem Folgenden, und hier kommt die negative (indirekte) Bedeutung der Bräunung für die Aromaentwicklung zum Ausdruck.

Zusammengefasst handelt es sich bei den bisher dargestellten Reaktionen in der ersten, anaeroben Hälfte der Fermentation also nicht um spezifische sondern um allgemeine lytisch-post-mortale Prozesse an Zuckern, Polyphenolen und Proteinen. Dann folgt die aerobe Phase, in der die enzymatische Phenoloxydation und die Bräunung als Folgereaktion allein den Ausschlag geben.

UMSETZUNGEN IN DER AEROBEN PHASE

Bekanntlich oxydieren Phenolasen *o*-Diphenole zu Chinonen und zwar nicht sehr substratspezifisch. Es lassen sich also alle Polyphenole des Kakaos (siehe oben) oxydieren. Der Luftsauerstoff dient dieser Oxydase dabei als Elektronenakzeptor. Die Chinone reagieren dann spontan und nichtenzymatisch durch Kondensation weiter zu braunen Phlobaphenen. Wegen der geringen Restaktivität kommt die Bräunung *nach* der Fermentation nur langsam zustande. Das Enzym wurde in neuerer Zeit etwas eingehender untersucht (22) : Die Restaktivität ist keine unspezifische Cu-Katalyse. Das Enzym unterscheidet sich vom Gesamtenzym in frischen Samen aber in Löslichkeit, pH-Optimum u.a. Vermutlich handelt es sich um eine modifizierte Form. Tatsächlich ist die Restaktivität « unlöslich », nach QUESNEL aufgrund von GERBUNG (22). Aber denkbar ist auch, dass multiple Formen vorliegen, wie man sie bei der besser untersuchten Phenolase des Tees gefunden hat (23, 24), wobei diese organellgebunden sind.

Diese typischen Reaktionen an den Polyphenolen sind von verschiedenen Autoren für die Aromaentwicklung verantwortlich gemacht worden, insbesondere von der Trinidad-Gruppe. Das würde den Vorstellungen der Aromabildung bei der Teefermentation entsprechen (11). So ist wie für den Tee (11) auch für den Kakao (25) folgende Reaktion angenommen worden :

Bekanntlich reagieren Chinone leicht mit Aminen und SH-Verbindungen in folgender Weise :

Abb. 7 : Bei saurem und neutralem pH, also unter physiologischen Bedingungen, ist diese Reaktion vor der reinen Chinon-Kondensation bevorzugt (26). Auch hierbei entstehen durch fortgesetzte Oxydation und Kondensation braune Produkte.

Nach enzymatischer Oxydation der Phenole und Bildung solcher Verbindungen mit Aminosäuren kommt es über Bildung von Chinoniminen, Umlagerung und Desaminierung zur Freisetzung von Aldehyden (26). Dabei kann ein Aminophenol zahlreiche Aminosäuren katalytisch desaminieren, in dem es durch die Phenolase stets reoxydiert wird. Das macht sich an einem vermehrten Sauerstoffverbrauch bemerkbar. Aminosäuren stehen im Kakao nach der anaeroben Phase ausreichend zur Verfügung. Dennoch ist dieser Weg der Aromabildung im Kakao (25) hypothetisch.

Nach Untersuchungen von ROHAN (18) sind Aminosäuren, Zucker und Flavonoide bei der Bildung des eigentlichen Schokoladenaromas beim Rösten beteiligt.

Das wurde durch Fraktionierung und Analyse des aromabildenden Methanolextraktes und Rösten der gereinigten Komponentengemische festgestellt. Aber die Aromabildung erwies sich als unabhängig vom Sauerstoff, so dass eine Aromabildung, induziert durch die Phenolase, nicht in Betracht kommt. Nach einer neueren Arbeit von MOHR muss sogar angenommen werden, dass das eigentliche Schokoladenaroma nur aus Aminosäuren und Zuckern, also etwa durch reine Maillardreaktionen bei der Röstung zustande kommt (1).

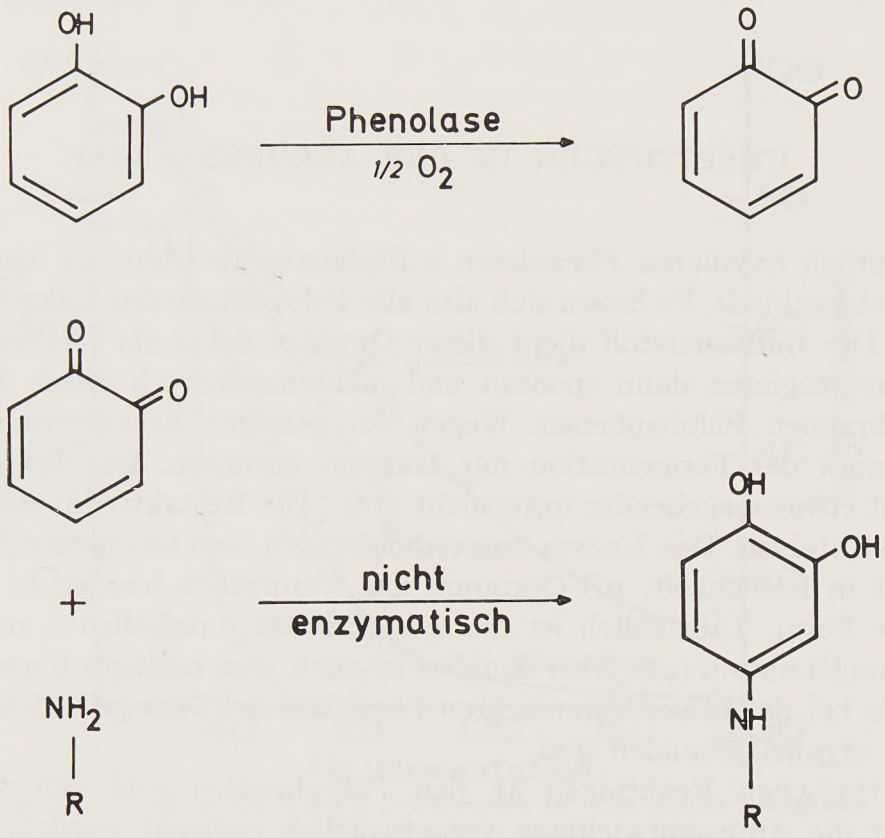


ABB. 7.

Daraus ergibt sich erneuert die Frage, welches denn nun die angenommenen Precursoren des Aromas sind, wie sie bei der Fermentation gebildet werden und welche Bedeutung denn überhaupt die Polyphenole haben.

Von FORSYTH und MITARBEITERN ist herausgestellt worden, dass bei der Fermentation eine strenge Folge von erst anaeroben und dann aeroben Bedingungen eingehalten werden muss, wenn Schokoladenaroma gebildet werden soll (27). Im Verlaufe einer üblichen Fermentation sind diese Bedingungen in den Samen tatsächlich gegeben (28). An der Luft zerriebene frische Kotyledonen bräunen spontan, entwickeln beim Rösten aber kein Aroma.

Es lässt sich zeigen, dass die Polyhydroxyphenole und das Phenolase-System tatsächlich eine wesentliche Bedeutung für die Aromaentwicklung haben, obgleich sie offensichtlich nicht als Aromavorstufen in Frage kommen. Ihretwegen ist die strenge Folge anaerob — aerob nachweislich ausschlaggebend :

Bekanntlich reagieren nicht nur Amine und Aminosäuren sondern auch Proteine mit Chinonen unter Bildung stabiler hochmolekularer brauner Verbindungen. Die Reaktion ist prinzipiell die gleiche, erfolgt jedoch wesentlich besser und bevor-

zugt mit Proteinen (Peptideffekt) (26). Es handelt sich um die Chinongerbung der Proteine, die von der eigentlichen Tanningerbung durch dimere Proanthocyanidine zu unterscheiden ist :

Die Tanningerbung erfordert keine enzymatische Oxydation. Sie kommt durch H-Brücken zwischen den dimeren Proanthocyanidinen und den Proteinen zustande. Der Gerbungseffekt kann durch entsprechende polare Agentien aufgehoben werden (29).

Die Chinongerbung wird unter physiologischen Bedingungen enzymatisch durch die Phenolase eingeleitet, erfordert also Luftsauerstoff. Die Gerbung kann durch zahlreiche Chinone erfolgen und führt zu stabilen Protein-Phenolverbindungen, welche nicht wie Tanningerbungen aufgehoben werden können.

Folgendes Schema experimenteller Ergebnisse gibt Auskunft, wie stark die enzymatische Proteinhydrolyse von der strengen Folge anaerob-aerob abhängig ist und zwar dadurch, dass sie durch Chinongerbung vollständig blockiert wird, durch Tanningerbung dagegen nicht (30, 31). Die Tanningerbung kann sofort nach dem Zellaufschluss, also unter anaeroben Bedingungen einsetzen, die Chinongerbung erst, wenn O_2 der Luft in die Samen dringt (*Abb. 8*).

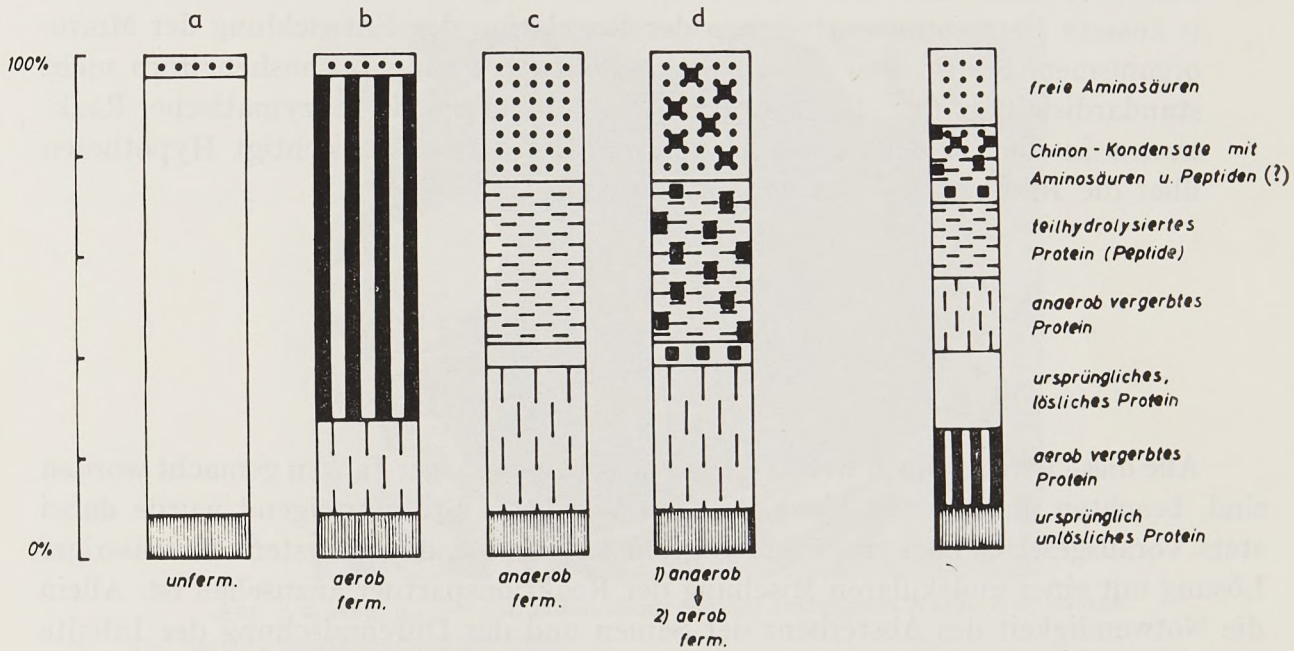


Abb. 8. — *Veränderungen der Proteine durch die Fermentation. Die Graphik symbolisiert die Anteile an unveränderten Proteinen Protein-Hydrolysaten* (Aminosäuren, Peptide), *Chinon und tanningegerbten Proteinen nach verschiedenen künstlichen Fermentationen. Die rechte Säule veranschaulicht die Symbole.*

Künstliche Fermentation wurden unter verschiedenem Gaswechselv orgenommen:

a) Das Protein frischer Samen ist zum grössten Teil löslich (schwach alkalische, wässrige Extraktion). Freie Aminosäuren sind nahezu nicht vorhanden.

b) Wird nach dem Zellaufschluss sofort unter aeroben Verhälnissen fermentiert, so wird das meiste Protein augenblicklich durch Chinongerbung unlöslich. Die Proteinhydrolyse ist vollständig blockiert. Die Proteine werden elektropheretisch verändert (31).

c) Wird zuerst unter anaeroben Bedingungen fermentiert, so wird das Protein normalerweise zu ca. 30-35 p. 100 zu Aminosäuren und Peptiden hydrolysiert. Zwar

erfolgt eine Tanningerbung aber keine Chinongerbung. Die Tanningerbung verhindert die Proteinhydrolyse nicht. Fermentation unter Ausschluss der Phenole zeigen, dass die Hydrolyse nur etwas reduziert wird (von ca. 60 p. 100 auf ca. 35-40 p. 100 des Gesamtproteins). Eine effektive Inaktivierung der Proteinasen wird also durch die Tanningerbung (21) nicht verursacht.

d) Folgt der anaeroben Phase eine aerobe, so kann nur noch wenig ursprüngliches Protein durch Chinone vergerbt werden, dagegen können Aminosäuren und Peptide im folgenden mit Chinonen zu löslichen Kondensaten reagieren. Diese wurden aber bisher nicht nachgewiesen.

Praktisch heisst das also, dass zuerst anaerobe Bedingungen herrschen müssen, damit überhaupt Aminosäuren als Vorläufer für das Schokoladenaroma frei werden, bevor Bräunungen eintreten. Tatsächlich gibt es ungünstige Fermentationsabläufe, bei denen sofort zum Aufschlusszeitpunkt Sauerstoff in die Samen dringen kann.

Die verschiedenen Enzyme — Glycosidasen, Proteinasen und Phenolasen — müssen also durch die äusseren Fermentationsbedingungen so gesteuert werden, dass die erforderliche Reaktionsfolge gewährleistet ist.

Es ist wiederholt versucht worden, durch Zugabe von Enzymen und Substraten den Fermentationsablauf zu beeinflussen. Zugaben zur Fruchtfleischmasse (« äussere Fermentation ») dienen der Regulation der Entwicklung der Mikroorganismen. Sie ist aber in den herkömmlichen Fermentationsbehältern nicht standardisierbar (7). Die Zugabe von Substraten für enzymatische Reaktionen in den Samen selbst (Vakuuminfiltration) berücksichtigt Hypothesen über die Bildungswege der Aromastoffe (32).

STRUCTURELLE ASPEKTE

Alle diese Erfahrungen, welche in den 50 iger und 60 iger Jahren gemacht worden sind, beachten nur die rein biochemischen Vorgänge. Stillschweigend wurde dabei stets vorausgesetzt, dass die Fermentation wie ein Reaktionssystem in wässriger Lösung mit einer molekularen Mischung der Reaktionspartner anzusehen ist. Allein die Notwendigkeit des Absterbens der Samen und der Durchmischung der Inhalte der beiden verschiedenen Zelltypen wurde beachtet. In Wirklichkeit enthält der Kakaosame wesentlich mehr Fett als Wasser. Ausserdem handelt es sich nicht um eine Lösung sondern ein Gewebe. Die Komponenten, die miteinander beim späteren Rösten reagieren sollen, sind im lebenden Samen nicht nur auf 2 verschiedene Zelltypen verteilt. Die plasmatischen Bestandteile sind in hohem Grade innerhalb der Zellen kompartmentiert, Enzyme und Substrate also voneinander getrennt (Glycosidasen und Proteinasen z. B. in Sphaerosomen (33), Phenolasen in Plastiden oder Mitochondrien (34, 35), Reserveprotein in Aleuronvakuolen, Flavonoide in Zellsaftvakuolen, etc.). Diese Strukturen in den Kotyledonenzellen messen 5 μ und weniger. Nach Feinstzermahlung in der Schokoladenfertigung wird nicht unter die Partikelgrösse von 10-20 μ aufgebrochen (6). Selbst wenn also in den unfermentierten Samen bereits alle für die Aromabildung beim Rösten erforderlichen Komponenten vorhan-

den, aber noch voneinander getrennt wären, so könnte nicht erwartet werden, dass sie beim Rösten oder Conchieren miteinander später reagieren, insbesondere nicht beim Rösten ganzer Bohnen.

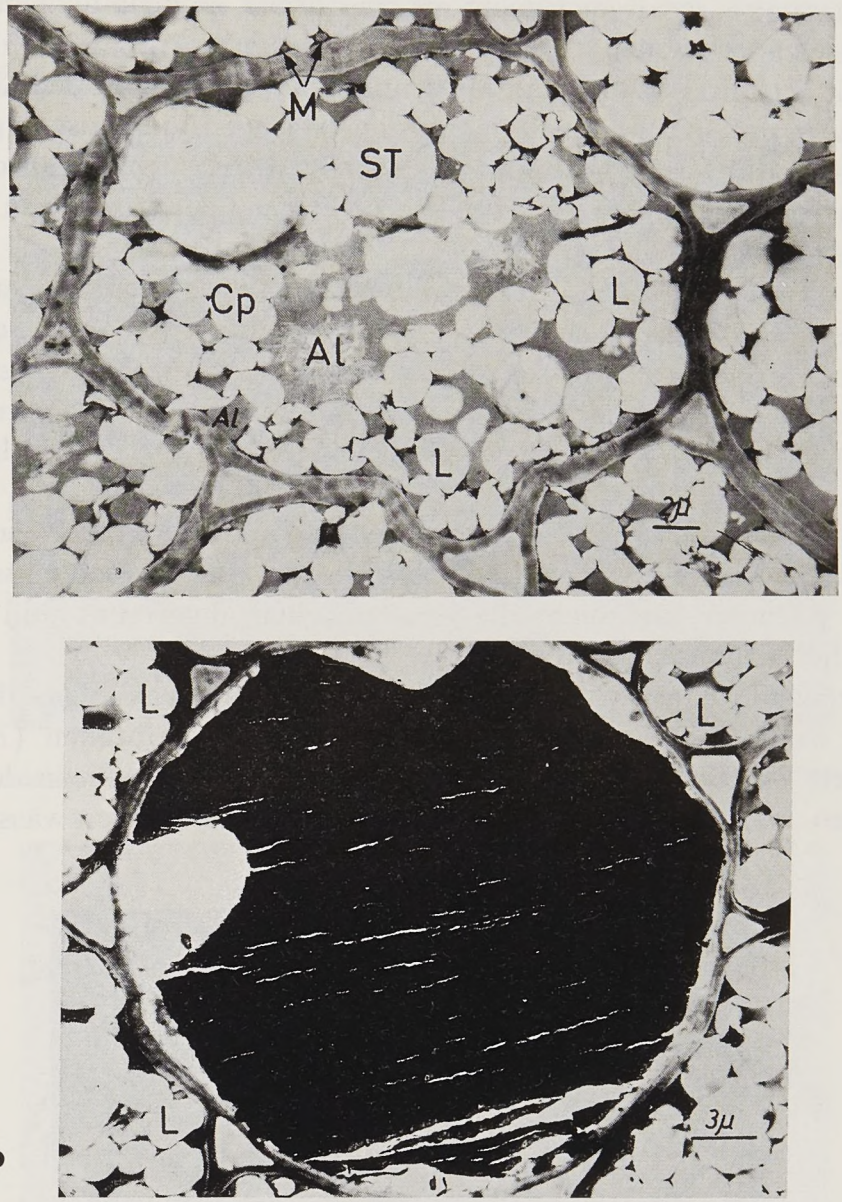


Abb. 9 *a*, Abb. 9 *b*. — *Ultradünnschnitt von unfermentierten Kakao-Kotyledonen*

9 *a*) parenchymatische Speicherzellen
9 *b*) Polyphenolzelle (die zentrale Vakuole ist von einem plasmatischen Wandbelag umgeben)
Primärvergrösserung 2.000 : 1.

Methodische Angaben. Ultradünnschnitte : 3 Stunden fixiert mit Formol-Glutaraldehyd (1 : 1), Endkonzentration 3 p. 100. 3 Stunden nachfixiert mit 1 p. 100 Osmiumtetroxid.
Gefrierätzung, Balzers 360 M : 120 Sekunden bei — 100°C geätzt. Bedampfung mit Platin-Kohle unter einem Winkel von 45°. Siemens-Elmiskop I A.
Für die elektronenmikroskopischen Bilder gelten folgende Symbole : Al = Aleuron, Cp = Cytoplasma, FL = fusionierte Lipidvakuolen, plasmatische Bereiche umschliessend, K = Kern, KM = Kernmembran, L = Lipid, M = Mitochondrium, PE = Plasmaeinschluss (im unfermentierten Samen differenziert, im fermentierten durch Hydrolyse homogen), PG = Plasmagrenzschicht der Lipidvakuolen, PZ = Polyphenolzellen, St = Stärke, V = Vakuole der Polyphenolzelle, W = Zellwand.

Das besagt, dass keine chemische Konzeption über eine Bildung spezieller Aromavorstufen benötigt würde, um zu erklären, warum unfermentierter Kakao beim Rösten kein Aroma liefert. Man kann die Bedeutung der Fermentation dann als

Mischvorgang in wässriger Phase, ausgelöst durch enzymatische Hydrolysen verstehen. Tatsache ist aber, dass Monosaccharide und Aminosäuren Grundsubstanzen für die Aromabildung sind (1, 18). Diese werden erst während der Fermentation frei. Sie können also, wenn auch nicht als spezifische, so doch als generelle Aromavorstufen bezeichnet werden.

Wie weit ihre Freisetzung und Mischung abhängig ist von den Veränderungen der Feinstruktur im Verlaufe der Fermentation, ist Gegenstand unserer gegenwärtigen Arbeiten. Das soll an elektronenmikroskopischen Aufnahmen veranschaulicht werden. (Die ausreichende Fixierung und Kontrastierung der fettreichen Gewebe stellt dabei ein besonderes Problem dar).

Abb. 9 : Wir erkennen auf Ultradünnschnitten frischer Kakaokotyledonen die beiden bereits erwähnten Zelltypen : Die parenchymatischen Speicherzellen und die Polyphenolzellen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erlauben einen Einblick in strukturelle Einzelheiten der Kakaosamen, die bisher mit Ausnahme weniger alter lichtmikroskopischer Untersuchungen (36-38) vernachlässigt worden sind.

Die Polyphenolzellen enthalten ausser der Vakuole sehr wohl Plasma mit eingeschlossenen Lipidvakuolen. Vermutlich hat Brown (12) in nichtwässrigen Medien die nackten Vakuolen und nicht die ganzen Zellen abgetrennt und darum keine Proteine in dieser Fraktion gefunden.

Die Parenchymzellen sind vollgepfropft mit Lipidvakuolen, die aber stets voneinander isoliert sind durch Plasma oder Plasmamembranen (?). Die grosse Masse an Fett (55 Gewichtsprozent) bildet also isolierte Inseln in der netzartigen und spärlichen, aber doch in sich geschlossenen, kontinuierlichen wässrigen Plasmaphase.

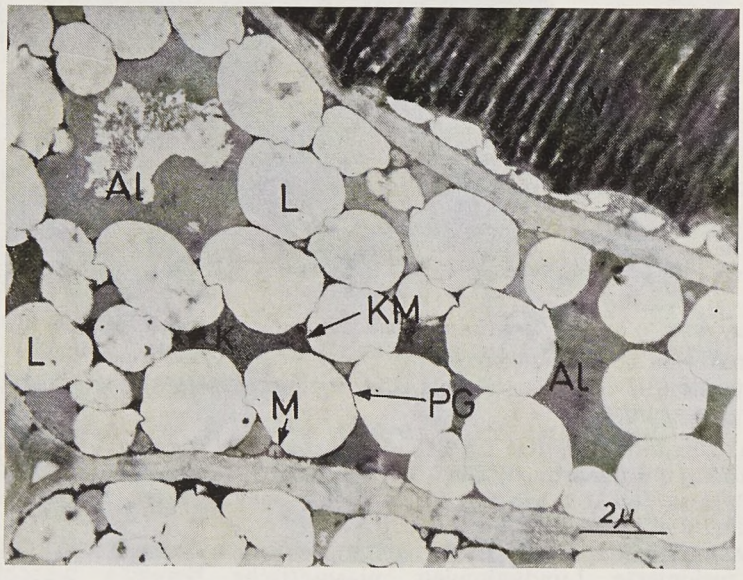


Abb. 10. — *Primärvergrösserung 4 000 : 1*
Ultradünnschnitt von unfermentierten Kakao-Kotyledonen

Es lassen sich im Plasma, abgegrenzt vom Cytoplasma, welches auf kleine Zwickelbereiche beschränkt ist, Aleuronvakuolen und Amyloplasten nachweisen. Die Amyloplasten bestehen fast ausschliesslich aus einem Stärkekorn. Membranen lassen sich nur zum Teil nachweisen.

Abb. 10 : Im Plasma sind aber auch Mitochondrien, Kerne und zum Teil Plasmamembranen erkennbar.

Abb. 11 : Durch eine andere Präparationstechnik, die Gefrierätzung, bestätigt sich, dass die Lipidvakuolen isoliert liegen und Aleuron und Cytoplasmabereiche deutlich voneinander getrennt sind. Der hohe Fettgehalt erlaubt es nicht, in diesem Objekt Kristallisationen bei der Präparation zu vermeiden.

ABB. *11 — Primärvergrösserung 4 000 :1*
Gefrierätzabdruck aus einer Parenchymzelle von unfermentierten Kakao-Kotyledonen

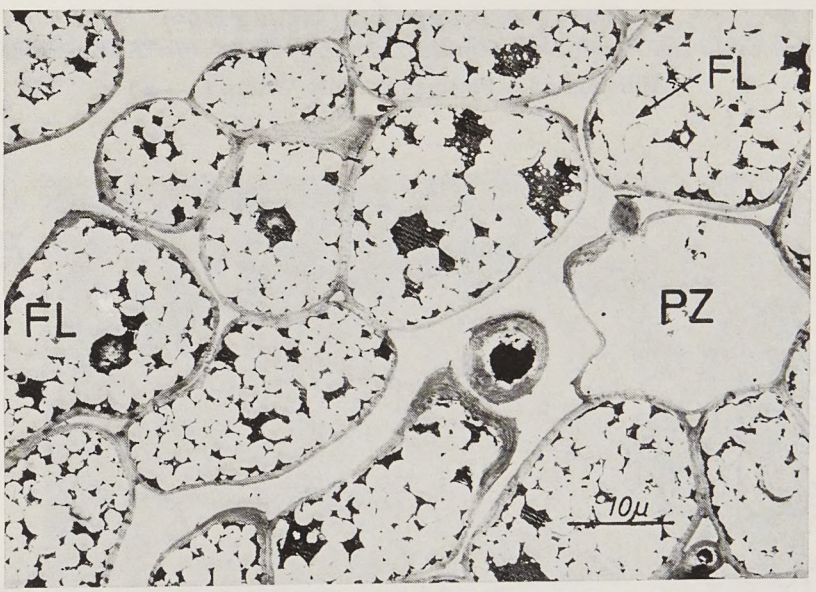


ABB. 12. — *Primärvergrösserung 900 :1*
Ultradünnschnitt von Kotyledonen künstlich fermentierter Kakaosamen

Abb. 12 + 13 : Fermentiert man unter künstlich eingestellten Bedingungen anaerob bis zum Absterben (Eindringen von Essigsäure, 45-50 °C) und 24 Stunden darüberhinaus, so kommt es zu folgenden charakteristischen Veränderungen :

1. Der Zellverband ist gelockert durch Lösung der Mittellamellen. Pektinase und Galakturonidase-Aktivität wird in fermentierendem Kakao gefunden (17).

Diese Ablösung ist Voraussetzung dafür, dass beim Trocknen das Gewebe porös bleibt und dadurch Sauerstoff aufnehmen und bräunen kann und dass nicht lederartig geschrumpfte, violette Bohnen entstehen, die als qualitativ minderwertig abgelehnt werden.

2. Der Inhalt der Polyphenolzellen ist ausgetreten.

3. Im Plasma sind keine Differenzierungen in Grundplasma, Aleuron und Mitochondrien mehr nachweisbar.

4. Das Plasma hebt sich blasig von der Wand.

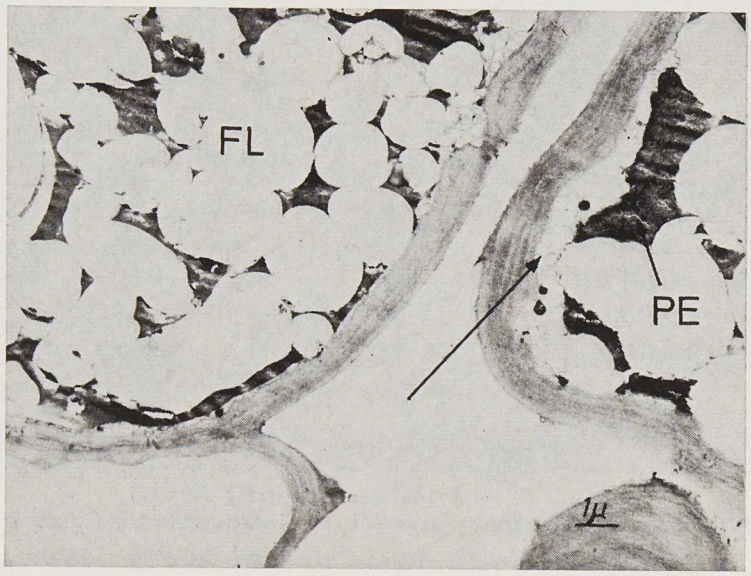


Abb. 13. — *Primärvergrösserung 4 000 : 1*
Ultradünnschnitt von Kotyledonen künstlich anaerob fermentierter Kakao-Samen, Detail
Abhebung des Plasmas von der Wand. (⟶)

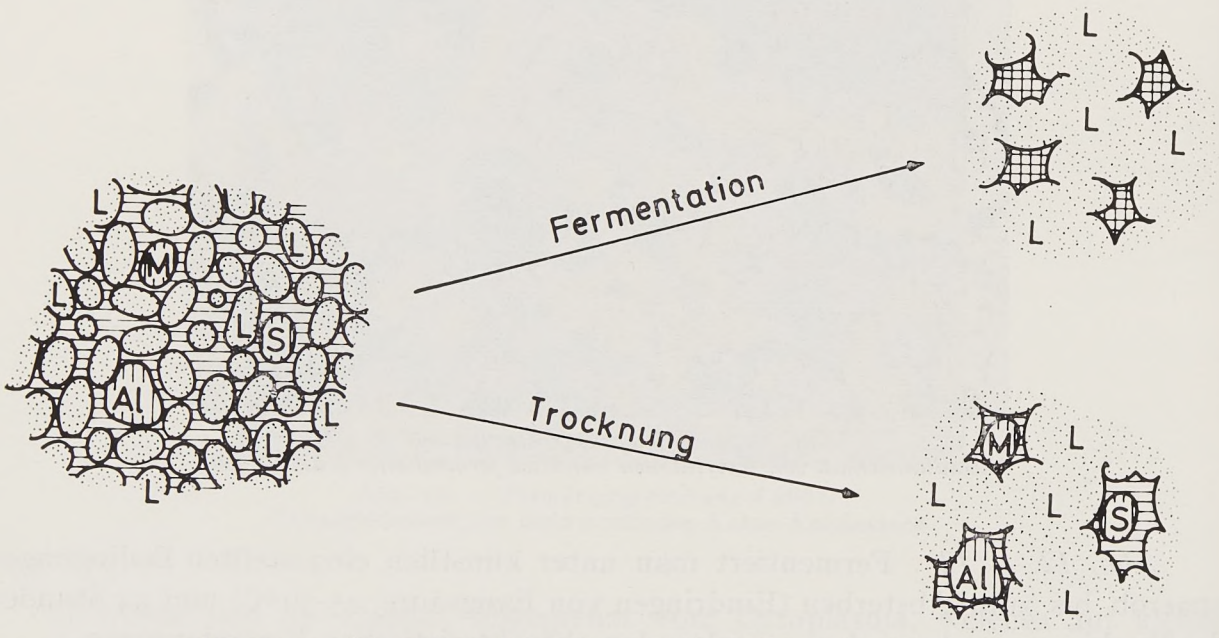


Abb. 14. — *Schematische Darstellung der Veränderung der Feinstruktur der parenschymatischen Kotyledonenzellen bei der Fermentation und bei der Trocknung*
Isolierte Lipidvakuolen in kontinuierlicher wässriger Plasmaphase werden überführt in eine kontinuierliche Lipidphase, isolierte plasmatische Bereiche umschliessend

5. Am auffälligsten ist die Fusion der Lipidvakuolen. Plasmatische Bereiche sind darin als Inseln in der Lipidphase eingebettet. Die plasmatischen Grenzschichten (oder Membranen (?)) zwischen den Vakuolen sind zerrissen und zusammengeschrumpft (*Abb. 14*).

Abb. 15 : Die Fusion der Lipidvakuolen und der Einschluss des Plasmas in isolierte Bereiche lässt sich auch in gefriergeätzten Präparaten nachweisen. Eine Differenzierung innerhalb der wässrigen Plasmaphase ist aufgehoben.

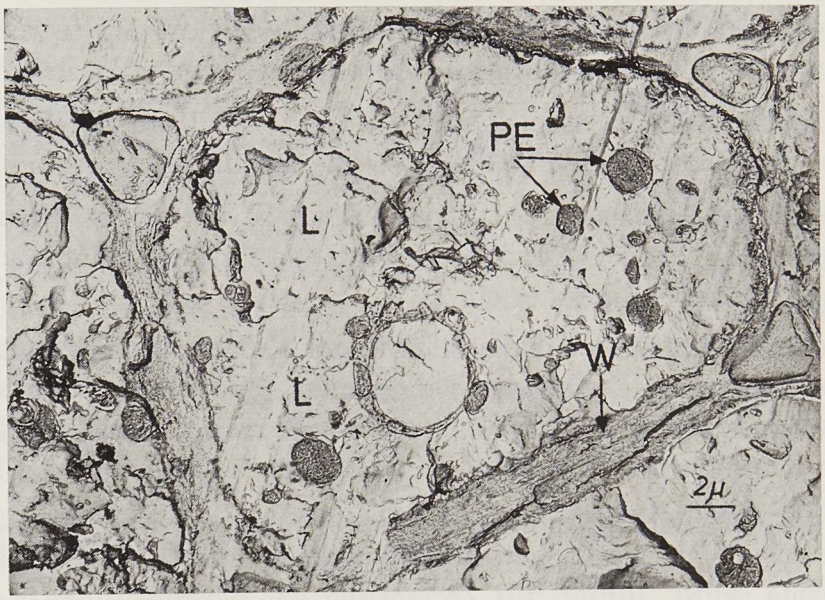


Abb. 15. — *Primärvergrösserung 2 000 : 1*
Gefrierätzabdruck von Kotyledonen künstlich anaerob fermentierter Kakao-Samen

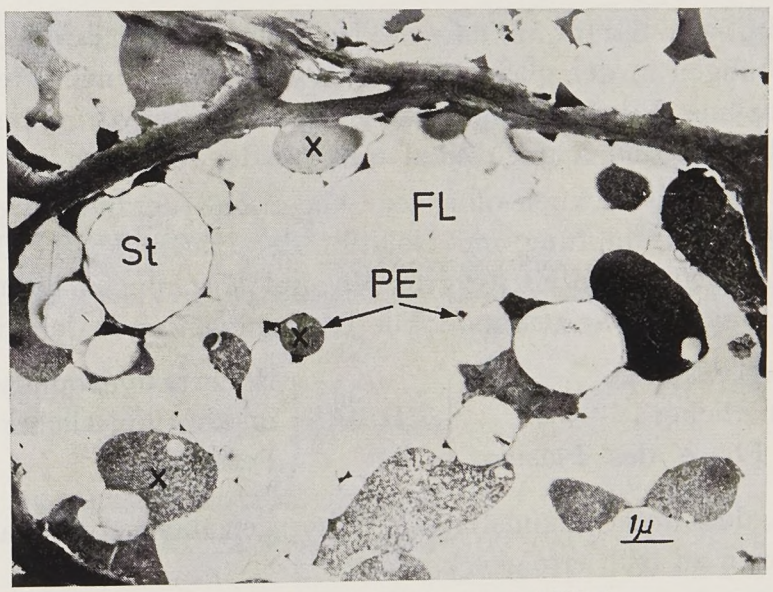


Abb. 16. — *Primärvergrösserung 2 000 : 1*
Ultradünnschnitt von parenchymatischen Speicherzellen der Kotyledonen aus unfermentierten und bei Zimmertemperatur getrockneten Kakao-Samen

In den plasmatischen Bereichen lassen sich Organellen und Kompartimente nach der Trocknung im einzelnen nich differenzieren. Die Differenzierung innerhalb der plasmatischen Bereiche (×) ist jedoch deutlich nachweisbar.

Abb. 16 : Werden unfermentierte Samen an der Luft getrocknet, so kommt es nicht zur Fusion aller Kompartimente. Die Lipidvakuolen fusionieren aber auch hier ähnlich wie oder in stärkerem Masse als bei der Fermentation. Es entstehen auch hier plasmatische Inseln in einer kontinuierlichen Lipidphase. Mitochondrien, Aleuronvakuolen, Kerne etc. bleiben isoliert und lassen sich auch am lufttrockenen Objekt teilweise kontrastieren.

Dieses sind einige Aspekte aus laufenden systematischen Untersuchungen von Zuchammenhängen zwissen den Wirkungen
1) physikalischer Aussenfaktoren, 2) enzymatischer Reaktionen und 3) von Veränderungen cytologischer Feinstrukturen. Danach kann die Bedeutung der morphologischen Gliederung und Strukturveränderungen folgendermassen angesprochen werden :

1. Das biochemische Fliessgleichgewicht und die Kompartmentierung in der lebenden Zelle verhindern unkontrollierte, einseitig gerichtete lytische Reaktionen.

2. Physikalische Einflüsse von aussen, wie z.B. die Temperaturerhöhung auf 52°C stören dieses Gleichgewicht und leiten derartige einseitig ablaufende postmortale Reaktionen, insbesondere lytische, ein.

3. Diese führen ihrerseits zur Aufhebung der Kompartmentierung (z.B. Entbindung von Enzymen von Oberflächen, Zerstörung begrenzender Membranen), ermöglichen dadurch gesteigerte lytische Umsetzungen und schliesslich die molekulare Mischung aller Komponenten innerhalb der zunächst in sich kontinuierlichen plasmatischen Wasserphase.

4. Entweder die physikalischen Bedingungen, vermutlich aber die Abbaureaktionen im Plasma selbst, führen zur Zerstörung der plasmatischen Begrenzung der Lipidvakuolen. Darum fusionieren diese.

5. Die Fusion der Lipidvakuolen geht so weit, dass — umgekehrt wie im lebenden Samen — die plasmatische Wasserphase wie Inseln isoliert in eine kontinuierliche Lipidphase eingeschlossen ist (*Abb. 14*).

6. Es kommt also darauf an, dass die Lipidfusion nicht erfolgt, bevor die erforderlichen Mischungen in der plasmatischen Wasserphase eingetreten sind. Andernfalls können Enzyme, Substrate und Reaktionspartner in hydrophilen Inseln voneinander isoliert bleiben und folglich nicht miteinander reagieren.

7. Bereits das Austrocknen ohne jede chemische Veränderung führt zu dieser Lipidfusion unter Schrumpfung und Isolation der Plasmabezirke. In ihnen bleiben Kompartmentierungen erhalten. Hydrolysen und Mischungen hydrophiler Komponenten kommen nicht mehr zustande. Die Bedingungen, mit der diese Umkehr

isolierte Fettvakuolen in kontinuierlicher wässriger Phase des Plasmas → isolierte hydrophile Einschlüsse in kontinuierlicher Fettphase

eintritt, zeigen, dass unter ungünstigen Bedingungen auch bei der Kakaoaufbereitung diese Fettfusionen zu früh erfolgen könnten.

8. Ist der Same erst einmal getrocknet, so ist eine Mischung der wasserlöslichen Komponenten in der viskosen Fettmasse nicht mehr möglich. Ihre molekulare Mischung ist nur in der wässrigen Aufbereitungsphase möglich, welche allein die Fermentation ist. Die früher oft empfohlene Wasserbehandlung trockener Rohkakao-

partien schlechter Qualität holen möglicherweise diesen Mischeffekt nach und beruhen nicht auf spezifischen chemischen oder enzymatichen Wirkungen, wie angegeben wird (39).

SCHLUSSFOLGERUNG

Bei der Kakaofermentation werden durch den mikrobiellen Pulpaabbau Bedingungen erzeugt, die zum Absterben des Kotyledonengewebes und zu anschliessend anaeroben enzymatisch-lytischen Umsetzungen der Flavonoidglycoside, Disaccharide und vor allem der Proteine führen. Der Sauerstoffaufschluss ist erforderlich, um durch Chinongerbung nicht die Proteinhydrolyse zu unterbinden, die durch Tanningerbung unter anaeroben Bedingungen nicht verhindert wird.

Kakaoaroma wird nur beim Rösten bereits fermentierter Samen erzielt, offensichtlich ohne Bedeutung oxydativer Prozesse. Die Veränderung der Feinstruktur in den Samen spielt dabei offensichtlich eine ausschlaggebende Rolle. Von ihr ist die enzymatische Hydrolyse der Proteine und also die Bildung der Aromavorstufen abhängig, ebenso aber auch die Durchmischung der Reaktionspartner, welche für den Röstprozess Voraussetzung ist. Die Bedeutung dieser strukturellen Aspekte ergibt sich bei der Kakaoaufbereitung vornehmlich aus dem hohen Fettgehalt und der Umkehr.

kontinuierl. plasm. Wasserphase, isol. Lipideinschlüsse
↓ ↓ ↓
isolierte Plasmaeinschlüsse, kontinuierliche Lpidphase

Zweifellos haben diese strukturellen Aspekte überall ihre Bedeutung für Enzymreaktionen, wo Lebens-oder Futtermittel nicht als molekulare Mischung sondern in Form von Gewebebrocken vorliegen, z. B. bei der Wirking von Lipasen und Lipoxygenasen in Nüssen. Sie sind sicherlich beim Kakao besonders kritisch.

DANKSAGUNG

Die Untersuchungen zur Feinstruktur wurden durch finanzielle Hilfe des Bundeswirtschafts, ministeriums B. R. D. über die A. I. F. an den Forschungskreis der Ernährungsindustrie unterstützt. Sie waren möglich dank der ausgezeichneten Assistenz von Fräulein Renate ENDEWARD.

RÉSUMÉ

PROBLÈMES ENZYMOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES DANS LA PRÉPARATION DU CACAO

Les changements intervenant dans les fèves de cacao au cours de la fermentation sont provoqués par une fermentation anaerobie, tout en consistant en une suite directe de modifications dans les cotylédons qui sont catalysés par les enzymes propres des grains. Pour la formation des arômes du chocolat une fermentation préalable est indispensable et l'on suppose qu'il y a formation de précurseurs d'arômes au cours de la fermentation. Toutefois, les seules investigations

chimiques n'ont pas réussi à mettre en évidence de tels précurseurs qui restent hypothétiques. Les aspects cytologiques n'ont été que peu étudiés. Nous nous efforcerons dans notre exposé de démontrer que la modification des structures cellulaires présente une importance primordiale pour la qualité du cacao brut et pour le développement ultérieur des arômes. Les changements *post mortem* de l'ultrastructure sont provoqués par des processus enzymatiques lytiques. Il y a libération de sucres et d'acides aminés qui fournissent l'arôme du cacao. Après une brève étude de la fermentation « externe » et « interne » du cacao, on traitera des réactions enzymatiques les plus importantes, l'hydrolyse des protéines et la glycolyse.

Des photos obtenues par microscopie électronique permettent d'apprécier les détails de l'ultrastructure des 2 types cellulaires des cotylédons.

On verra que dès la fermentation, il y a un transfert important :

vacuoles lipidiques isolées, dans la phase continue, aqueuse du plasma ⟶ inclusions hydrophiles / inclusions dans la phase continue lipidique

Si jusque-là, les enzymes et leurs substrats n'ont pas été libérés, à partir de leurs compartiments (séparés) et si les partenaires réactionnels hydrosolubles n'ont pas été mélangés sur le plan moléculaire. Ils vont rester séparés par la phase lipidique dans les fèves de cacao séchées, au cours de la torréfaction.

La taille des compartiments plasmatiques d'une part, et la taille des grains de la masse de chocolat d'autre part, semblent interdire un mélange ultérieur, au cours de la préparation.

SUMMARY

ENZYMOLOGICAL AND CYTOLOGICAL PROBLEMS IN COCOA PREPARATION

The changes occuring in cocoa nibs during fermentation are caused by anaerobic fermentation while being a direct result of modifications in the cotyledons which are catalyzed by the nibs' own enzymes. For the formation of chocolate aromas a preliminary fermentation is essential and it is assumed that aroma precursors are formed during the fermentation. However, chemical investigations alone did not succeed in showing such precursors which remain hypothetical. The cytological aspects have not been studied in detail. We shall endeavour, in our paper, to demonstrate that the modifications of cellular structures is essential for the quality of raw cocoa and the later development of aromas. The *post mortem* changes in ultrastruture are caused by lytic enzymatic processes. There is a liberation of sugars and amino acids which supply the cocoa aroma. After a short study of the « external » and « internal » fermentation of the cocoa, the most important enzymatic reactions, hydrolysis of proteins and glycolysis, will be dealt with.

Photographs obtained with the electronic microscope permit ultrastructural details of the two cellular types of cotyledons to be determined.

It will be seen that immediately after fermentation there is an important transfer :

isolated lipidic vacuoles in the aqueous continuous phase of the plasma ⟶ isolated hydrophilic inclusions in the lipidic continuous phase

If, up to this point, the enzymes and their substrates have not been liberated from their compartments (separate) and if the hydrosoluble reactional partners have not been mixed, from the molecular point of view, they will remain separated by the lipidic phase in the nibs of the dried cocoa during torrefaction.

The size of plasmatic compartments, on the one hand, and the size of grains of the bulk of the chocolate, on the other hand, appears to prevent further mixing, during the preparation.

LITERATUR

(1) Mohr W., Rohrle M., Severin TH., 1971. *Fette, Seifen, Anstrichmittel. Die Ernährungsindustrie*, **73**, 515.

(2) Flament J., Wilhalm B., Stoll E., 1967. *Helv. chim. Acta*, **50**, 2233.

(3) Marion J. P., Müggler-Chavan F., Viant R., Bricout J., Reymond D., Egli R. M., 1967. *Helv. chim. Acta*, **50**, 1509.

(4) Praag M., van Stein H.S., Tibbetts M.S., 1968. *J. agric. Food Chem.*, **16**, 1005.
(5) Knapp A.W., 1937. *Cacao Fermentation*, London, John Bale, Sons and Curnow.
(6) Finke H., 1965. *Handbuch der Kakaoerzeugnisse*, Springer Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl.
(7) Roelofsen P.A., 1958. *Advances in Food Res.*, **8**, 225.
(8) Forsyth W.C.G., Quesnel V.C., 1963. *Adv. Enzymol.*, **25**, 457.
(9) Rohan T.A., 1963. « Processing of raw cocoa for the market » *F. A. O., Agric. Stud.*, nº 60.
(10) Roesch E., Schubiger G.F., Egli R.H., 1961. *B. F. M. I. R. A., Sci. Techn. Survey*, nº 38, S. 3.
(11) Bokuchava M.A., Skobeleva N.-I., 1969. *Adv. Food Res.*, **19**, 215.
(12) Brown H.B., 1954. *Nature*, **173**, 492.
(13) Forsyth W.G.C., Roberts J.B., 1960. *Biochem. J.*, **74**, 374.
(14) Weinges K.W., Bahr W., Ebert K., Görlitz K., Marx H.D., 1969. *Fortschr. chem. org. Naturstoffe*, **27**, 158.
(15) Quesnel V.C., 1968. *Phytochem.*, **7**, 1583.
(16) Forsyth W.C.G., 1952. *Biochem. J.* **51**, 516.
(17) Holden M., 1959. *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 691.
(18) Rohan T.A., 1970. *Gordian, Hefte*, 1-4.
(19) Biehl B., 1955. *Gordian*, **55** (1321), 17 und **55** (1322), 13.
(20) Biehl B., 1958. Dissertation, Hamburg. und (1961), *Gordian*, **61**, (1444) 14-20.
(21) Forsyth W.G.C., Quesnel V.C., Roberts J.B., 1958. *J. Sci. Food Agric.*, **9**, 181.
(22) Quesnel V.C., Jugmohunsingh K., 1970. *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 537.
(23) Bendall D., Gregory R., 1963. *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pergamon Press.
(24) Takeo T., Uritani I., 1966. *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 155.
(25) Purr A., Springer R., Morcinek H., 1960. Rep. *VIII Int. Am. Cacao Conf. Trinidad and Tobago S.* **65** und 1960. *Z. Lebensm. Untersuch.*, **112**, 40.
(26) Mason H. S. 1955. *Adv. Enzymol.*, **16**, 105.
(27) Forsyth W.G.C. 1957. *Rep. Cocoa Conf. London S.* 145.
(28) Quesnel V.C., 1960. *Chem. and Ind. S.*, 101.
(29) Grassmann W., Endres H., Oppelt M., Sissi H.E., 1959. *Das Leder*, **10**, 149.
(30) Biehl B., 1963. *Z. Lebensm. Untersuch.* **119**, 105.
(31) Biehl B., 1967. *Z. Lebensm. Untersuch.*, **133**, 145.
(32) Purr A., Helfenberger A., Nadai J., 1962. *Rev. Int. Choc.*, **17**, (8), 3.
(33) Matile Ph., Balz J.P., Semadeni E., Jost M., 1965. *Z. Naturf.*, **20** *b*, 693.
(34) Hofer A., 1964. *Planta*, **62**, 137.
(35) Takeo T., 1965. *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo), **29**, 558.
(36) Tschirsch A., 1887. *Arch. Pharm.*, **25**, 605.
(37) Gassner 1931. Mikroskopische Untersuchungen pflanzlicher Nahrungsund Genussmittel, Jena.
(38) Hanssen E.G., Dodt E., 1954. *Mikroskopie*, **9**, 11/12, S. 357-363.
(39) Biehl B., 1962. *Gordian*, **62**, (1478/79), 11.
(40) Biehl B., 1968. *Gordian*, **68**, (1616), 260.
(41) Birch H. F., 1941. *Ann. Rep. Cacao Res.* Nr. 22-33.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (3), 457-472.

ENZYMATISCHE VORGÄNGE IN KAKAOBOHNEN WÄHREND DER FERMENTATION BEI ANWENDUNG DER VAKUUMINFILTRATION (1)

A. PURR

Heckenstallerstrasse 171,8, München 25 (R. F. A.)

ZUSAMMENFASSUNG

Der Fermentierungsprozess von Kakaobohnen verfolgt den Zweck, erwünschte Aromastoffe und Aromavorstufen in Kakaobohnen zu bilden, sowie die Adstringens (Herbheit) in Kakaoerzeugnissen zu vermindern. Viele dabei auftretende, biochemische Veränderungen, die während der Fermentierung festgestellt werden, sind auf enzymatische Wechselwirkungen zurückzuführen. Das Vorkommen von Amylasen, Proteasen, Lipasen, Phosphatasen, Pektinesterasen, Polygalakturonase, Katalase, Peroxydase, Polyphenoloxydase, Aminosäure-Decarboxylase sowie Coenzym A, konnten durch eigene Versuche eindeutig nachgewiesen werden.

Gekoppelte Reaktionen zwischen Proteasen-Peptide, Aminosäuren) und Polyphenoloxydasen (*o*-Chinone), sowie nicht enzymatisch ablaufende oxydative Desaminierungen der Aminosäuren, (katalysiert durch entstandene Addukte/*o*-Chinon + Aminosäuren/), konnten unter Bildung Aromastoffen (Carbonyle) aufgezeigt werden.

Mit Hilfe der Vakuuminfiltration wurden Untersuchungen durchgeführt, diese gekoppelten enzymatischen Reaktionsabläufe in Kakaobohnen gezielt zu steuern oder deren Ablauf zu beschleunigen. Die Ergebnisse der Infiltrationsversuche, die vor der Fermentierung mit frisch geernteten Kakaobohnen vorgenommen wurden, zeigten, dass Kupfersalze als Cofaktor der Polyphenoloxydase, Proteine, Proteinhydrolysate, Kakaobohnen ähnliche Aminosäure-gemische nach einer Temperatur und pH kontrollierten Kurzfermentierung und Trocknung, der so behandelten Bohnen, einen günstigen Einfluss auf die Bildung von Aromastoffen in den Kakaobohnen haben. Dieser erwünschte Effekt wurde organoleptisch mit Schokolademustern als Testmaterial beurteilt.

Das entwickelte Vakuum-Infiltrationsverfahren mit Enzymen oder Verbindungen die die Enzyme katalysieren, ist wegen der nachgewiesenen Leitstungsfähigkeit, ein empfehlenswertes Beispiel für gezielte Untersuchungen bei der Fermentierung von Kakaobohnen unter Berücksichtigung enzymatischer Vorgänge, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit der Aromabildung. Das Verfahren stellt auch eine Modifizierung des gewerbemässigen « curing » Prozesses in Aussicht.

EINLEITUNG

Die Fermentation ist die wichtigste Behandlungsart der Kakaobohnen in den tropischen Anbauländern. Dieser Prozess ist an der Entwicklung von Aroma, Geschmack und Farbe bei den aus fermentierten Bohnen hergestellten Kakao-Erzeugnissen ausschlaggebend mitbeteiligt.

(1) Erweiterte und ergänzte Fassung eines Vortrages anlässlich des *13e Symposium international sur l'emploi des enzymes dans les Industries agricoles et alimentaires*. Paris, 14, 15 et 16 février 1972.

unfermentierte Kakaobohnen (KB) —Fermentation→ Aromavorstufen —Trocknung→ fermentierte getrocknete KB-Rösten → Kakao-Aroma

Nicht fermentierte Kakaobohnen liefern bei der Schokolade-Herstellung kein Aroma.

Bei den Untersuchungen zur Klärung der Frage von enzymatischen Vorgängen in Kakaobohnen während der Fermentation bei Anwendung der Vakuuminfiltration verfolgten wir im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten die folgenden Zielsetzungen :

a) Das Vorkommen bereits bekannter Kakao-Enzyme zu überprüfen und im Zusammenhang damit bisher unbekannte Enzyme in unfermentierten Bohnen nachzuweisen und deren Aktivitäten zu ermitteln.

b) Ein einheitliches Bohnenmaterial von vorausbestimmbarer Qualität zu erhalten, durch Klärung folgender Fragen : In welcher Weise während der üblichen-Aufbereitung der unfermentierten Kakaobohnen enzymatische Abbauvorgänge, gekoppelt mit chemischen Umsetzungen, ablaufen können, und welchen Einfluss solche Rückkoppelungen auf die Bildung von Aromavorstufen haben.

c) Entwicklung einer Kurzfermentation (Short Curing) bei Anwendung der Vakuuminfiltration, die in den tropischen Anbauländern von Kakaobohnen, aber auch bei der verfahrenstechnischen Herstellung von Kakao-Erzeugnissen durch führbar sein soll.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN UND DIE AKTIVITÄT VON ENZYMEN IN UNFERMENTIERTEN KAKAOBOHNEN

Für die Untersuchungen, die im Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung und im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, München, Bahia (Brasilien), Turrialba (Costa Rica) und Tafo (Ghana) zur Verfügung, wobei mit Hilfe der « cup-plat-method », der manometrischen Methode nach Warburg, dem viskometrischen Messverfahren und titrimetrischer, sowie kolorimetrischer Methoden die Aktivitäten verschiedener Enzyme in frischen, ungekeimten und verschieden lange gekeimten Bohnen untersucht wurden.

Aus dem Ergebnisstand der bisherigen Enzymstudien kann man schliessen, dass von den Hydrolasen die Amylasen, Glykosidasen, Pektinesterasen, Acetylesterasen, Lipasen und Proteinasen, von den Oxydasen die Polyphenoloxydase sowie das Coenzym A in Kakaobohnen stark vertreten sind. Die Konzentration der übrigen Enzyme (Phosphatasen, Polygalakturonasen Katalase, α-Decarboxylase), die bis jetzt festgestellt wurden, ist vergleichsweise zu verschiedenen pflanzlichen Produkten niedrig. Erstmalig konnte Acetylesterase, Lipase, Proteinase, α-Decarboxylase und Coenzym A nachgewiesen werden. (1) Die Untersuchungen zur Auffindung weiterer Enzyme sind keineswegs als abgeschlossen zu betrachten.

Die Bildung des Kakaobrauns und die Ausbildung der Aromavorstufen dürften an das Zusammenwirken dieser aufgefundenen Enzymsysteme, zelleigener und mikrobieller Herkunft gebunden sein, so dass deren Aktivitäten während der Fermen-

tation, neben anderen Faktoren, wie Qualität der Ausgangsbohnen, Trocknung und Röstung (2) für eine harmonische Geschmacksempfindung der fertigen Kakao Erzeugnisse ausschlaggebend sein dürften.

EINFLUSS DER ENZYMATISCHEN-CHEMISCHEN RÜCKKOPPELUNG, DER « FEED BACK MECHANISMUS », AUF DIE BILDUNG VON AROMAVORSTUFEN WÄHREND DER FERMENTATION

Enzymatische Reaktionen laufen nicht immer ab, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen. Im Zusammenhang mit dem hier untersuchten Problem konnte gezeigt werden, dass gekoppelte Reaktionen, sogenannte Schrittmacher Reaktionen, auch in den Kakaobohnen während der Fermentierung bestehen. Gekoppelte Reaktionen treten zwischen den bei der enzymatischen Brenzcatechin-oxydation durch Kakao-Polyphenoloxydase entstehenden primären Oxydationsprodukten und Proteinen, Peptiden, sowie den im Kakaoproteinvorhandenen Aminosäuren ein (3).

POLYPHENOL		PROTEIN
↓	POLYPHENOLOXYDASE	↓ PROTEINASE
o-CHINON	+	AMINOSÄUREN——→ADDUKT

Verbindungen mit Substituenten, die Elektronendonatoren darstellen, wie Hydroxy oder Aminogruppen, stabilisieren durch Herabsetzung des Redox-potentials Chinone (4). In diesem Sinne ist das L-Prolin, dessen starke Förderung der Sauerstoffaufnahme in Kombination mit anderen Aminosäuren nachgewiesen wurde, besonders wirksam.

Die im Rahmen der Untersuchungen beobachteten Reaktionen schaffen auch Voraussetzungen für eine Umsetzung mit einem weiteren Molekül Aminosäure. Aminosäuren reagieren mit Chinonen sowohl durch nucleophile Substitutionen als auch durch Chinoniminbildung. Versuche anderer Autoren deuten darauf hin, dass nach Reduktion des Chinons durch Anlagerung eines Moleküls Aminosäure an den Phenolring (nucleophile Substitution) eine nochmalige Oxydation dieses Adduktes durch Polyphenoloxydase möglich ist. (4 *a*).

Das so entstandene *o*-Chinon kann ein zweites Molekül Aminosäure an einer seiner CO-Gruppe anlagern, wobei ein Chinonimin entsteht, aus dem sich durch eine Umgruppierung Phenolimin bildet. Der weitere Reaktionsablauf ist dem schematisch dargestellten Kreisprozess (I) der Abbildung 1 zu entnehmen (5).

Über eine Verminderung der Adstringens durch entstehende unlösliche Polyphenol-Proteinkomplexe berichten FORSYTH und Mitarbeiter (6). In diesem Zusammenhang bestätigen SCHUBIGER und Mitarbeiter (7) die Bildung von Peptido-Polyphenol-Komplexen, die sowohl Gerbstoffeigenschaften als auch Proteinreaktionen zeigen.

Das aus *o*-Chinon und Aminosäuren entstandene Addukte katalysiert ohne Mitwirkung der Polyphenoloxydase die oxydative Desaminierung der Aminosäuren, so dass es zu einer « indirekten Oxydation der Aminosäuren » kommt (8).

PROTEIN
↓ PROTEINASE
AMINOSÄURE + 1/2 O_2 ——→ ADDUKT ——→ alfa-KETOSÄURE + NH_3
Bestandteil
von Fruchtaromen

Auf diese Weise können sich in den Kakaobohnen Aromastoffe bilden, wie beispielsweise aus Threonin beta-Hydroxy-alfa-Ketobuttersäure, die z.B. auch ein Bestandteil des Preiselbeer-Aromas ist (9). Glycin, die hier als besonders wirksam erkannte Aminosäure, wird zu Glyoxylsäure, Alanin zur Brenztraubensäure desaminiert (10), was mit einer hohen Steigerung der Sauerstoffaufnahme, als Zeichen für die geförderte Aktivität der Polyphenoloxydase verbunden ist. Das gleiche Verhalten zeigten die Aminosäuren Threonin, Serin und Lysin. Die genannten Aminosäuren sind übrigens auch am Aufbau der Kakaoproteine stark beteiligt. In diesem Zusammenhang ist besonders hervorzuheben, dass die Peptide Glycyl-Glycin und Glycyl-Leucin eine höhere Sauerstoffaufnahme bewirken als die Aminosäuren. Offen sichtlich spielt aber auch bei den Peptiden die Aminosäure-sequenz eine Rolle. Während sich das Glycyl-Leucin als eine sehr stark aktive Substanz erweist, ist das Leucyl-Glycin ohne Einfluss. Dieser Befund ist interessant im Hinblick darauf, dass reduzierende Zucker, z. B. Arabinose, Xylose (Pentosen) bzw. Glucose, Fructose, Galaktose (Hexosen), die ebenfalls in den Kakaobohnen durch Glykosidasen gebildet werden, mit verschiedenen Peptiden bei Temperaturen zwischen 100-150°C in Reaktion treten, wobei die entstandenen Produkte im Verlauf einer Maillard-Reaktion schokoladeähnliche Aromen liefern. Besonders Glycyl-Peptide (z.B. Glycyl-Glycin) und Alanyl-Peptide (z.B.Alanyl-Glycin) sind zu dieser Aromabildung befähigt (11).

Der Wirkungsmechanismus der erstmalig in der Kakaobohne festgestellten alfa-Decarboxylase wird durch den Kreisprozess III der Abb. 1 veranschaulicht (12).

Dieser Prozess führt zur Bildung von Oxalessigsäure und Glutaminsäure aus alfa-Ketoglutarsäure und Asparaginsäure sowie zur Bildung von Brenztraubensäure und Glutaminsäure aus alfa-Ketoglutarsäure und Alanin. Alanin und Asparaginsäure konnten in fermentierten Kakaobohnen als Produkte der Proteolyse nachgewiesen werden. Die ausserdem aufgefundene Aminobuttersäure spricht ebenfalls für den Ablauf dieses Mechanismus während der Fermentierung.

Dieser Reaktionszyklus der gekoppelten Transaminierungen und Decarboxylierungen steht mit den Reaktionsfolgen der oxydativen Desaminierungen sowie mit denen des Fettsäure-, Citronensäure und Glyoxylsäurezyklus durch die entstehenden alfa-Ketosäuren (Oxalessigsäure und Brenztraubensäure) in Beziehung. Das in den Untersuchungen in Kakaobohnen ermittelte Coenzym A als wesentlicher Katalysator in aufgeführten Zyclen rundet das Bild im Sinne dieser Darlegungen ab. (Siehe schematische Darstellung (II) der Abb. 1).

Von den genannten Kreisprozessen gewinnt der Glyoxylsäurezyklus an Bedeutung. Die für den natürlichen Ablauf notwendigen Enzyme Isocitritase und Malat synthetase sind bisher nur in Mikroorganismen und fettreichen Samen nachgewiesen worden (13). Es zeichnen sich zwei Möglichkeiten einer Glyoxylsäurebildung in Kakaobohnen ab, einmal in Glyoxylsäurezyklus, zum andern über die bereits be-

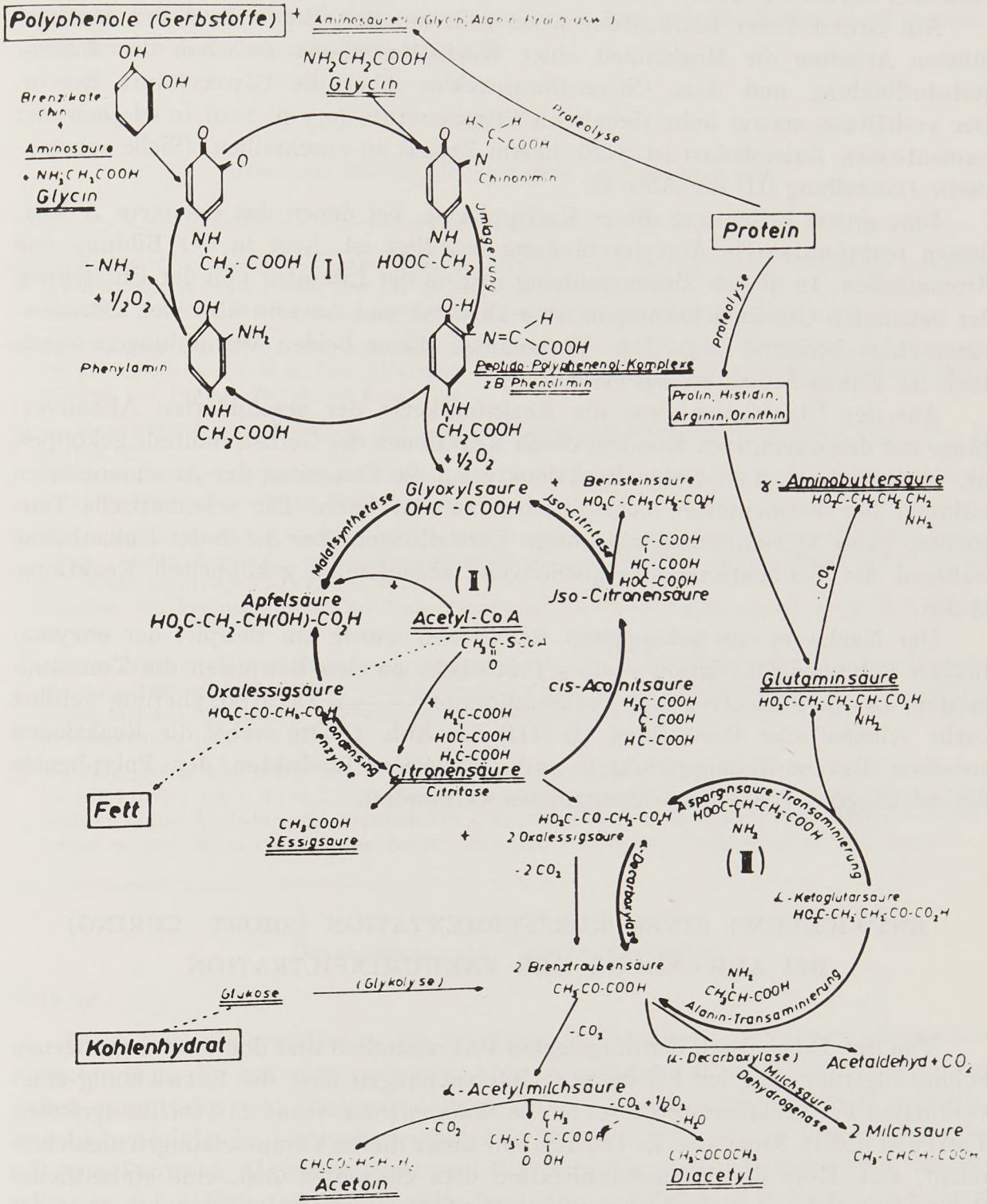


Abb. 1. — *Mögliche Reaktionswege und Wechselbeziehungen im intermediären Stoffwechsel der Kakaobohne während des Wachstums und der Fermentation und ihre Bedeutung auf die Bildung von Aromen und Geschmacksstoffen bei der Aufbereitung der Kakaobohnen zu Schokoladeprodukten.*

Nachgewiesene Reaktionsprodukte bzw. Reaktionspartner der Kreisprozesse (=) : (I) *Peptido-Polyphenol-Komplexe* (*Phenolimin*), *Proteine*, *Polyphenole* bzw. *Aminosäuren* durch Proteolyse (Glycin, Alanin, Prolin usw.) ; (II) *Fett*, *Citronensäure*, *Essigsäure* bzw. *Acetyl-CoA* ; (III) *Kohlenhydrate*, *Glucose*, *Acetoin*, *Diacetyl*, *gama-Aminobuttersäure* bzw. *Alanin*, *Asparaginsäure*, *Glutaminsäure*, *Histidin*, *Arginin*, *Ornithin*, *Lysin* (Proteolyse).

schriebene Phenoliminspaltung, so dass die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen den Glycin-Gerbstoff-Reaktionen und dem Glyoxylsäurezyklus erkennbar ist.

Auf Grund dieser Betrachtungsweise geht aus den Ergebnissen der durchgeführten Arbeiten die Möglichkeit einer Wechselbeziehung zwischen der Kakaogerbstoffbildung und dem Citronensäurezyklus über die Glyoxylsäure hervor. Der verhältniss mässig hohe Gehalt an Citronensäure (0,5 p. 100) in frischen und fermentierten Kakaobohen ist wohl diesem Zyklus zu zuschreiben. (Siehe schematische Darstellung (II) der Abb. 1).

Eine grosse Bedeutung dieser Kreisprozesse, bei denen das Coenzym A bzw. dessen reaktionsbereite Acetylverbindung beteiligt ist, liegt in der Bildung von Aromastoffen. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur von der Entstehung der bekannten Geschmackskomponenten Diacetyl und Acetoin über den Citronensäurezyklus berichtet (14). Das Vorkommen dieser beiden Verbindungen wurde auch im Kakao-Aroma nachgewiesen (15).

Aus der Überlegung, dass die Reaktionskette der geschilderten Abbauvorgänge mit den oxydativen Kondensations-Reaktionen der Gerbstoffanteile gekoppelt ist, wird gefolgert, dass diesen Reaktionszyclen die Steuerung der Aromavorstufen während der Fermentation zugeschrieben werden kann. Die schematische Darstellung (Abb. 1) veranschaulicht unsere Vorstellungen über die in der Kakaobohne während der Fermentierung möglicherweise ablaufenden gekoppelten Reaktionszyclen.

Der Nachweis von gekoppelten Reaktionen wurde am Beispiel der enzymatischen Polyphenoloxydation ——→ Proteolyse, an den Beispielen der Transaminierung ——→ Proteolyse und Transaminierung ——→ Decarboxylierung geführt (siehe schematische Darstellung (I) (III) der Abb. 1) (16) wobei die Reaktionen zwischen Eiweiss-Abbauprodukten und Oxydations-Produkten der Polyphenole die Adstringens von Kakao-Erzeugnissen vermindern.

ENTWICKLUNG EINER KURZFERMENTATION (SHORT CURING) BEI ANWENDUNG DER VAKUUMINFILTRATION

Von den Ergebnissen der dargelegten Enzymstudien und den daraus gezogenen Schlussfolgerung ging ich bei meinen Untersuchungen über die Entwicklung eines verkürzten Fermentationsprozesses am *Instituto interamericano de Ciencias agricolas, Turrialba* (Costa Rica) aus. Es erschien mir unter diesen Voraussetzungen aussichtsreicht, mit Hilfe der Vakuuminfiltration dem erstrebten Ziel, eine einheitliches Bohnenmaterial von vorausbestimmbarer Qualität zu erhalten, einigermassen näher zu kommen. Gestützt wurde das Vorhaben durch Versuche am Beispiel der Polyphenoloxydase, die bekanntlich ein Kupferproteid ist. Infiltiert man nämlich Lösungen von Kupfer (II)-Acetat, Aminosäuregemische + Kupfer (II)-Acetat in frisch pulpehaltige Kakaobohnen, so bewirkten diese einen Aktivitätsanstieg der Polyphenoloxydase bzw. einen stark gesteigerten Sauerstoffverbrauch, was auf gekoppelte Reaktionen im Sinn der oben erwähnten Auffassung hinweist (Siehe Kreisprozesse (I) der Abb. 1).

Diese gewonnene Erkenntnis liess es zweckmässig erscheinen, zu untersuchen welchen Einfluss die nach dem folgenden Arbeitsplan durchgeführten Infiltrations-Versuche auf die Verminderung der Adstringens und auf die Bildung von Aromavorstufen im Kotyledon haben. (16) (17).

TABELLE I

Übersicht über die durchgeführten Infiltrationsversuche

a) *mit Kupfer (II)-Acetat* (0,1-0,5 p. 100) allein und kombiniert mit Proteinen (0,1-0,5 p. 100, z.B. Gelatine), sowie Na-Acetat (0,1-0,2 molar) bei pH 4,0-5,8 ; vgl. l. a.) in Tab. 2.
(Studium des Einflusses künstlich gesteigerter Aktivität der Polyphenoloxydase),

b) *mit Proteinen* (0,1-0,5 p. 100, z.B. Gelatine) allein und kombiniert mit Na-Acetat (0,1 molar) bei pH 3,5-5,5 ; vgl. l. b) in Tab. 2 (Studium des Einflusses zur Verminderung der Adstringens durch Bildung von Peptido-Polyphenol-Komplexen),

c) *mit Proteinhydrolysaten* (0,1-0,5 p. 100, z.B. Gelatine/Kasein-Hydrolysate) bei pH 4,0-5,5 ; vgl. l. b) in Tab. 2,
(Studium des Einflusses gekoppelter chemischer Umsetzungen mit den Produkten der enzymatischen Polyphenoloxydation und der Proteolyse,

d) *mit Aminosäuregemischen*, die durch proteolytischen Abbau aus den Kakaoproteinen entstehen können : Glycin, Alanin, Asparagin- und Glutaminsäure (0,1-0,5 p. 100) allein und kombiniert mit Na-Acetat (0,1 molar) bei pH 4,0-5,5 ; vgl. l. b) in Tab. 2,
(Studium des Einflusses chemischer Umsetzungen mit Produkten der enzymatischen Polyphenoloxydation),

e) *mit Na-Acetat* (0,1 molar) allein und kombiniert mit Protein-hydrolysaten und Aminosäuregemischen (0,1-0,5 p. 100) vgl. l. c.) in Tab. 2 (Einfluss einer pH-Erhöhung in der Bohne in Abhängigkeit von gekoppelten chemischen Umsetzungen zwischen den Reaktionsprodukten der Proteolyse und den der Polyphenoloxydase) bei pH 5,9-6,0,

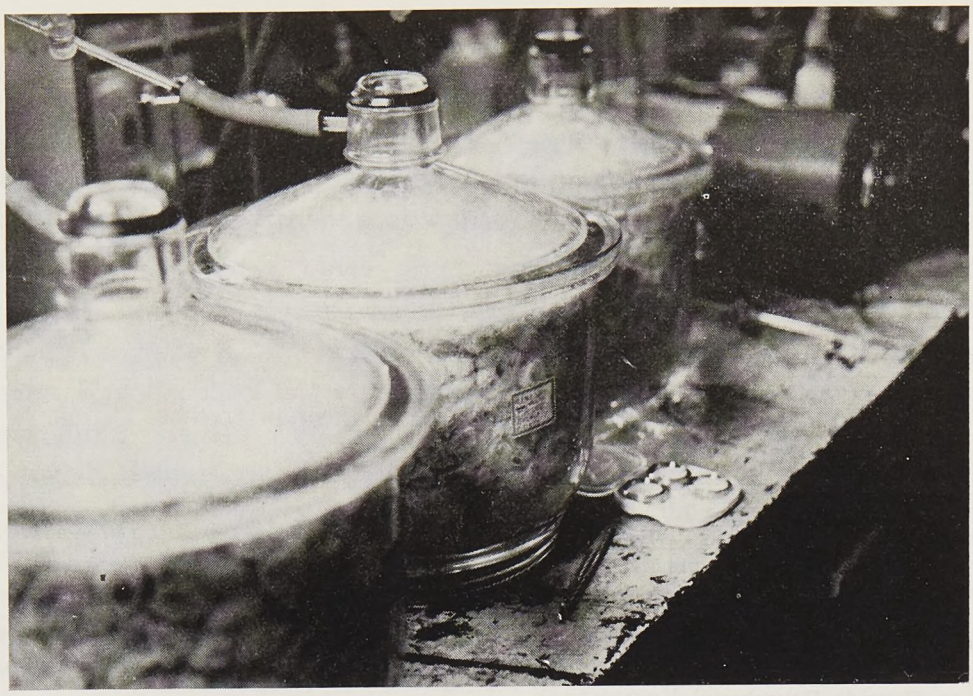
f) *mit Polygalakturonase* (0,2 p. 100 Trockenpräparat) allein und kombiniert mit Na-Acetat (6,1 molar) bei pH 4,0-6,0 ; vgl. l. d.) in Tab. 1 (Studium des Einflusses pektinspaltender Enzyme auf eine frühzeitigere diffuse Verteilung der Bohneninhaltsstoffe durch Abbau der Zellwandbestandteile des Kotyledons, so dass die erwünschte enzymatisch-chemische Umsetzung beschleunigt ablaufen kann.)

Durchführung der Vakuuminfiltration

Prinzip.

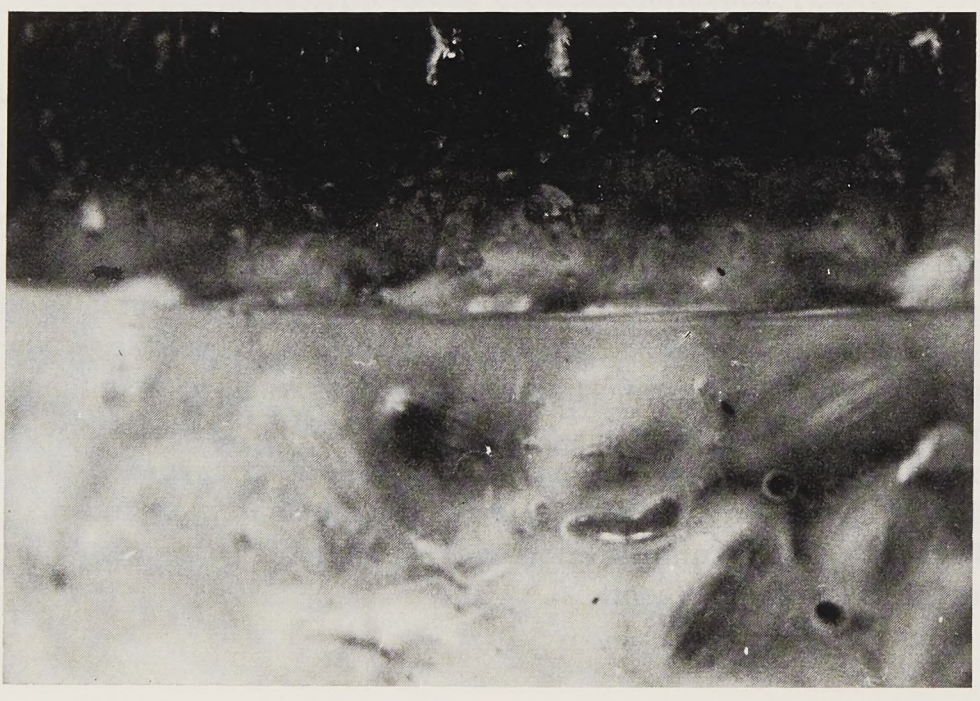
Diese Methode gestattet es, die Wirkung von Enzymen und Ablauf chemischer Umsetzungen, die mit enzymatischen Abbauvorgängen gekoppelt sind, in lebenden Zellen unmittelbar zu studieren. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, sowohl hydrolytische als auch synthetische Prozesse, die mit den Umwandlungen, z.B. von Pentosen, Hexosen, Proteinen, Polyphenolen usw. verbunden sind, unmittelbar in unbeschädigten Gewebszellen keimfähiger Bohnen zu studieren und deren Einfluss auf die Bildung von Aromavorstufen festzustellen. Auch ist auf diese Weise die Möglichkeit gegeben, Enzymlösungen, z. B. Proteasen, in keimfähige Kakaobohnen zu infiltrieren, so lange in der Zelle der normale physiologische Zustand erhalten bleibt und die notwendigen energetischen Vorausetzungen vorhanden sind, ist auch die Bedingung für enzymatische Reaktionsabläufe vorhanden.

Das Prinzip der Vakuuminfiltration wird durch die folgenden Abb. im Laboratoriumsmass-Stab veranschaulicht.



a

b



c

Durchführung.

In einem Vakuum-Exsikkator werden frisch geerntete Bohnen mit der Pulpa mit der Versuchslösung, die infiltriert werden soll, gut verrührt, wobei auf die erforderliche völlige Abdeckung der Bohnenmasse zu achten ist. Sodann wird mit Hilfe einer Ölpumpe oder Wasserstrahlpumpe bei einem Leitungsdruck von etwa 4 atü bis zu einem Druck von 10 bis 12 Torr (notwendig erreichbares Endvakuum) evakuiert. Das Evakuieren ist als beendet zubetrachten wenn keine Blasen aus der Bohnenmasse austreten, was bei einer Mass von 4,0 kg nach etwa 3 Stunden der Fall ist. Während des nachfolgenden Druckausgleichs, der allmählich erfolgen muss, wird die Versuchslösung in die Zellen hineingedruckt, wobei die Bohnen erst nach einer Wartezeit von etwa 8 bis 10 Minuten von der Versuchslösung mit Hilfe eines grobmaschigen Siebes abzutrennen sind. Danach werden die Bohnen einer Kurzfermentation unterworfen.

Durchführung der Kurzfermentation (Short Curing)

Die Fermentierung der mit einem feuchten Tuch bedeckten, infiltrierten Bohnen wird bei 60°C unter künstlich geregelten Temperaturbedingungen in einem Ofen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca = 100 p. 100 durchgeführt, wobei zu beachten ist, dass sich in etwa 6 Stunden die Temperaturangleichung in der Bohnenmasse einstellt, was eine Eingangstemperatur der Bohnen von ca 25°C und eine Schichthöhe der Bohnenmasse von 12 cm voraussetzt. Die Luftfeuchtigkeit wurde durch Aufstellen von wassergefüllten Schalen am Boden des Ofens eingestellt. Nach 24 stündiger Fermentierung werden die Bohnen entweder wie üblich an der Sonne oder künstlich im Ofen mit Luftumwälzung bei 60°C getrocknet.

Die pH-Kontrolle wurde mit den pulpehaltigen Kakaobohnen vor und nach der Infiltration sowie nach dem « Short Curing »-Prozess durchgeführt. Eine gewisse Kontrolle über den Fortgang und die gelungene Durchführung des « Short-Curing »-Verfahrens ergab sich durch den Cut-Test.

NORMALE FERMENTATION NACH ALLISON ROHAN

Zur Herstellung von Vergleichsproben (Blindproben) wurde eine normale Fermentation nach der von den genannten Autoren entwickelten Arbeitsvorschrift durchgeführt (18) (19).

ABB. 2. — *Durchführung der Vakuuminfiltration*

a) Drei Exsikkatoren gleichzeitig im Betrieb.

b) Vakuuminfiltration im Anfangsstadium. Starke Schaumbildung durch die aus den Bohnen herausperlenden Luft-und CO_2 - Blasen.

c) Am Ende der Vakuuminfiltration (die Entgasung der Bohnen ist beendet), keine Schaumbildung.

BEURTEILUNG DES EINFLUSSES DER KURZFERMENTATION AUF DIE QUALITÄT DER BOHNEN MIT HILFE DER ORGANOLEPTISCHEN UNTERSUCHUNGSMETHODIK

Das Ergebnis der mit der Infiltrationsmethodik unter Einbeziehung ausgewählter Versuchsvarianten durchgeführten Bohnenbehandlung wurde organoleptisch mit Schokolademustern als Testmaterial beurteilt. Die Muster wurden-bis auf den Kakao-unter Verwendung der gleichen Ingredienzien und nach dem gleichen Rezept in dem Forschungslaboratorium der Suchard Holding S. A., Neuchâtel (Schweiz), hergestellt, so dass die Benotung im Gesamten gesehen in erster Linie von der Bohnenqualität abhängt. Die Verkostung der Muster fand nach zwei Gesichtspunkten statt : *a*) Pauschale Gesamtbewertung nach einer Skala mit 10 Punkten : 10 = ausgezeichnet ; 9 = sehr gut ; 8 = gut ; 7 = noch gut ; 6 = hinlänglich ; 5 = mässig ; 4 = an der Grenze des Annehmbaren ; 3 = ziemlich schlecht ; 2 = schlecht ; 1 = sehr schlecht.

b) Bewertung besonders charakteristischer Einzelkomponenten des Geschmacks nach einer Skala mit 4 Punkten. Das aus der gegenseitigen Abstimmung der Einzelkomponenten sich ergebende Gesamtbild wurde in Form einer graphischen Darstellung aufgezeichnet und lieferte eine Art « Profil », wobei entlang der Abzissenachse die 6 bewerteten Komponenten : Das kräftige Hervortreten von Kakao-Aroma und Bitterkeit, die betonte Gegenwart von Süsse und das deutliche Zurücktreten der Herbheit, der Säure und der leicht flüchtigen Komponente, und entlang der Ordinatenachse die gegebenen Noten aufgetragen wurden (Abb. 3).

Als Vergleichsmass-Stab dienten die für die Hauptmasse der Fermentie rungsansätze nach dem Normalverfahren nach ALLISON und ROHAN (18) (19) in Abb. 3 und 4 eingetragenen oberen Grenzwerte, die für die Einzelkomponenten und die Gesamtbewertung der Geschmacksharmonie als ($X \mp 2\ S$) jeweils aus 12 Einzelwerten berechnet wurde. Die Berechnung der Standard-abweichung der Einzelwerte S erfolgte nach der Gleichung :

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x = Einzelwerte (Einzelkomponenten des Geschmacks) der 12 Messwerte,
$\bar{x}$ = Mittelwert der 12 Messwerte,
n = Anzahl der Messwerte (16).

Die auf diese Weise gefundenen Richtwerte, die sich natürlich nur auf das untersuchte Bohnenmaterial beziehen, werden hier als Norm gesetzt, die angestrebt werden soll. Zu diesem Verfahren wird man genötigt sein, wenn man sich auf eine Bohnensorte konzentriert. Ein Hinausgehen über diese Norm (di. i. das Normalverfahren nach ALLISON und ROHAN) wird voraussichtlich nur durch das Zusammenbringen von verschiedenen Bohnensorten bei der Herstellung der Schokoladenproben erreicht werden können (« Idealer Vergleichsmass-Stab ? »). Es ist aber schon als Fortschritt zu werten, wenn man mit einer Bohnensorte der besagten Norm

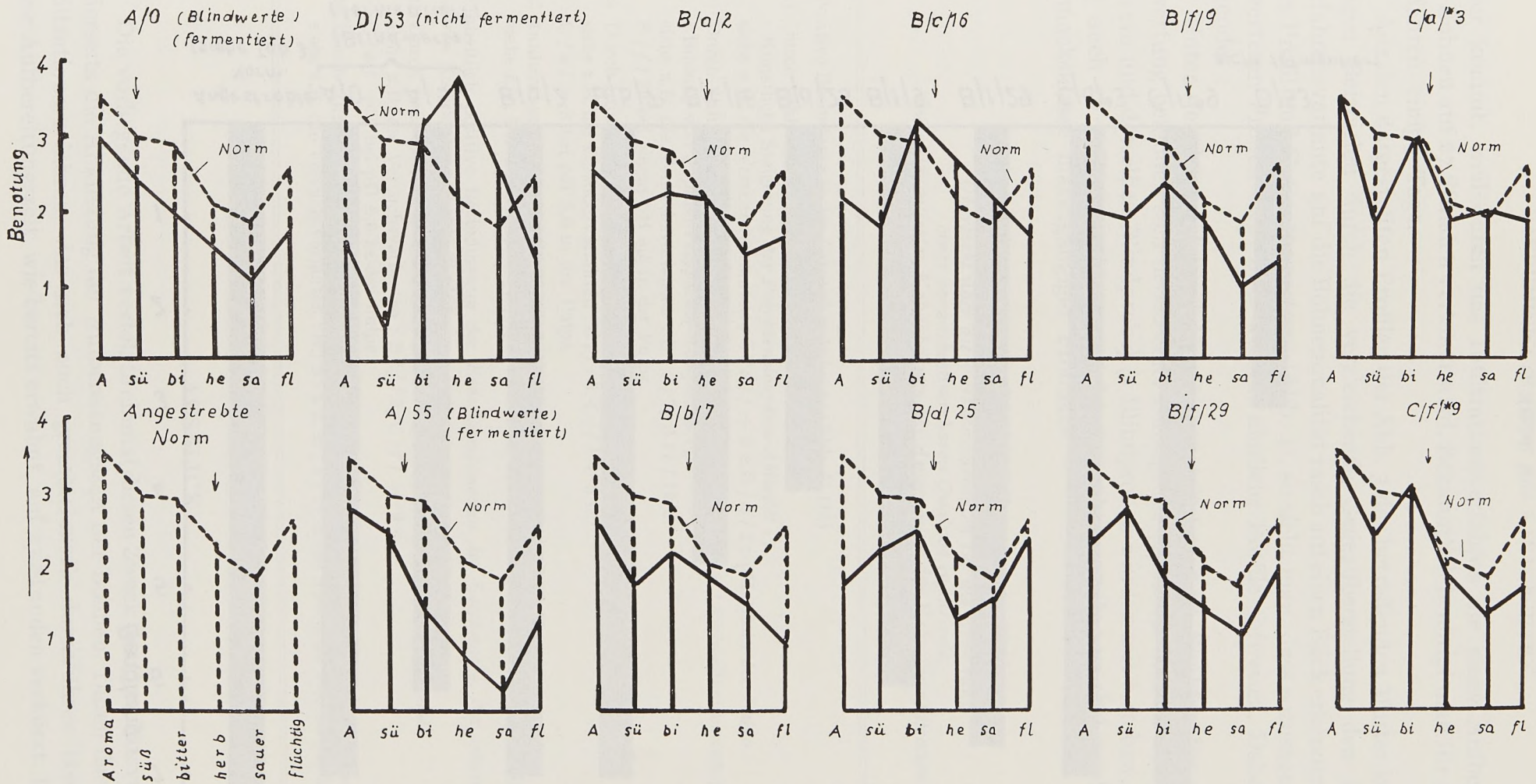


Abb. 3. — *Geschmacksprofile von 11 verschiedenen Schokoladeproben, hergestellt aus infiltrierten Bohnenmustern*

(Das angestrebte Profil (NORM) wurde nach der Formel ($x + 2\,S$ = obere Grenzwerte) aus je 12 Einzelwerten berechnet. Die ausgezogenen Linien zeigen die Ergebnisse von Einzelversuchen, die mit verschiedenen Versuchsvarianten durchgeführt wurden (16).

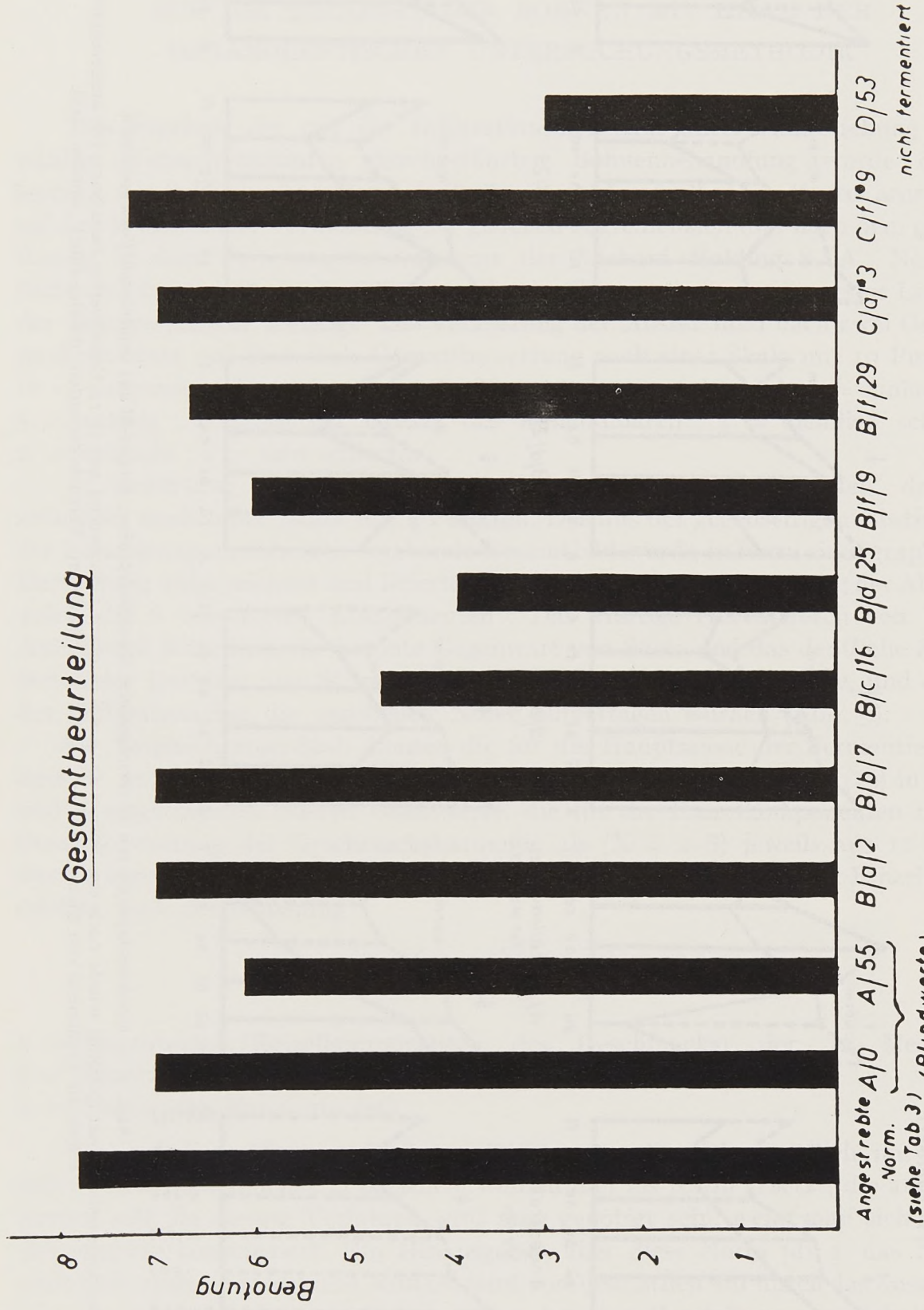


ABB. 4. — *Gesamtbeurteilung von 11 verschiedenen Schokoladeproben, hergestellt aus infiltrierten, kurzfermentierten Bohnenmustern*
Die angestrebte Norm ist vergleichend gegenübergestellt (16).

näher kommt, weil durch das Infiltrationsverfahren die nasse Aufbereitungszeit der Bohnen auf 27 Stunden verkürzt wird. Bekanntlich benötigt man für das Normalverfahren einige Tage.

Aus den dargestellten Profilen der Abb. 3 der betreffenden Muster kann man an einigen Beispielen durch die vergleichende Gegenüberstellung den Einfluss der Verfahrensvariante auf die Bohnenqualität rasch auf einen Blick erkennen. Vergleicht man Profil und Gesamtbewertung (Abb. 4), so sieht man, dass sozusagen alle höher bewerteten Proben mehr oder weniger ähnliche Profile aufweisen. Dabei ergab sich folgendes :

Unter den höchst bewerteten Proben mit 6,50-7,30 Punkten für die Gesamtbewertung befanden sich neben einer Blindprobe (Mittlerer Wert aus 10 Messwerten von ein und derselben Blindprobe) (2 Blindproben wurden mit 6,10 bzw. 5,90 bewertet) auch 10 infiltrierte Muster und entsprechen somit, pauschal gesehen, der Geschmacksklasse marktgängiger Produkte.

TABELLE 2

Übersicht über die Versuchsvarianten für die Ereichung einer vorausbestimmbaren Qualität infiltrierte, kurzfermentierter Kakaobohnen bei Anwendung der Vakuuminfiltration. Geprüft an hergestellten Schokolademustern

1. Positive Beeinflussung der *Gesamtbeurteilung* ; (Abb. 4) (16)

   a) Durch Infiltration von *Kupfer (II)-Acetat.*
   « Künstliche Steigerung der *Polyphenoloxydase-Aktivität* » ;
   siehe z.B. die Versuchsvarianten : C / *a* / / + 3 u.B / *a* / 2 ; pH 5,8 in der *Pulpa.*

   b) Durch Infiltration von *Proteinen sowie Protein-Hydrolysaten (Aminosäuregemische).*
   « Bildung von *Peptido-Polyphenol-Komplexen* » ;
   siehe z.B. die Versuchsvarianten : B / *b* / 7, B / *c* / 16 u.
   B / *f* / 29 bei einem pH 5,5 in der Pulpa.

   c) Durch Infiltration von *Na-acetat allein und Na-Acetat + Kupfer (II)-Acetat* ;
   siehe z.B. die Versuchsvarianten : B / *f* / 9, C / *f* / + 9 u.
   C / *a* / + 3 bei pH 6,0 in der Pulpa.

   d) Infiltration von *Polygalakturonase* ;
   siehe z.B. Versuchsvariante : C / *e* / + 14 in der Tab. 2 (in 16), bei pH 5,0 in der Pulpa.

2. Einheitlich positive Beeinflussung der *Einzelkomponenten des Geschmacks*, der *bitteren, herben und sauren* Komponente ; (Abb. 3) (16)

   a) Durch Infiltration von *Na-Acetat allein und Na-Acetat + Kupfer* (II)-*Acetat* ;
   siehe z.B. die Versuchsvarianten : B / *f* / 9, C / *f* / + 9 u.
   C / *a* / + 3 bei pH 6,0 in der Pulpa.

   b) Durch Infiltration von *Na-Acetat + Proteinen* sowie *Proteinhydrolysaten (Aminosäuregemische)* ;
   siehe z.B. die Versuchsvarianten : B / *b* / 4 u. B / *b* / 11 in der Tab. 2 (in 16), bei pH 5,8 in derPulpa.

AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit verfolgte einmal diesen Zweck der Qualitätsverbesserung, anderseits die Abkürzung der Aufbereitungszeit der Bohnen. Durch das entwickelte Infiltrationsverfahren, das sich auch grosstechnisch durchführen lässt, wird die nasse Aufbereitungszeit, wie bereits erwähnt, auf 27 Stunden verkürzt. Bei der unter

künstlicher Temperaturregelung durchgeführten Kurzfermentation bei der rückgekoppelte enzymatisch — chemische Umsetzungen ablaufen, bilden sich die Aromavorstufen, aus denen entsteht beim Erhitzen der Bohnen auf Rosttemperatur im Verlauf einer Maillard-Reaktion unter Umsetzung vom Aminosäuren, Dipeptiden, Polyphenoliminen und reduzierenden Zuckern (Glucose, Fructose) und Pentosen das Kakao-Aroma.

Der nächste Weg ist jetzt solch künstlich gelenkte Fermentationsverfahren zur Herstellung von Qualitäts-Kakao weiter zu entwickeln, wozu nunmehr in hohem Masse analytische Methoden zur objektiven Ermittlung der Aromaqualitäten durchgeführt werden müssen, wofür es heute ja schon Möglichkeiten gibt, wie beispielsweise die bereits in diesem Sinne angewandte Gaschromatographie (20) (21).

Es erhebt sich nun die Frage, welche praktische neben der wissenschaftlichen Bedeutung solche Untersuchungen haben. In diesem Zusammenhang ist zu erwâhnen, dass die bereits jetzt vorliegenden Untersuchungsergebnisse die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass die aus den tropischen Anbauländern angelieferten, sonnengetrockneten, in den Schokoladefabriken gegebenenfalls grob zerkleinerten Kakaobohnen durch Zusätze von ausgewählten Aminosäuregemischen, reduzierenden Zuckern und zugesetztem Na-Acetat bei einer pH-Einstellung des Versuchsansatzes auf 5,8-6,0, ohne oder bei Anwendung der Vakuuminfiltration, die Aromabildung bei der Herstellung von Schokoladeprodukten gelenkt zu steuern. Man gewinnt dadurch die Chance, wie sie auch bereits von namhaften Schokoladefabriken genutzt wird (private Mitteilung), zu erwünschten, charakteristischen Aromaqualitäten zu gelangen, wobei die Variationsbreite durch wechselnde Mengen an zugesetzten Gemischen von Glucose, Fructose (Hexosen), Arabinose-Xylose (Pentosen), Peptiden und Aminosäuregemischen, die aus entsprechend ausgewählten Proteinen durch Hydrolyse gewonnen werden können, besonders wandlungsfähig ist. (22) die für die Praxis massgebliche Leitlinie für die beispielsweise jeweils einzusetzenden Aminosäuregemische ist die aus der Literatur zu entnehmende bekannte Bausteinanalyse der Kakaoproteine der verschiedenen Kakaobohnensorten (23) (24).

Das entwickelte Vakuuminfiltrations-Verfahren mit Verbindungen, die Enzyme katalysieren, ist wegen der nachgewiesenen Leistungsfähigkeit, ein empfehlenswertes Beispiel für gezielte Untersuchungen bei der Fermentierung von Kakaobohnen unter Berücksichtigung enzymatischer Vorgänge, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit der Aromabildung. Das Verfahren stellt nicht nur eine Modifizierung des gewerbemässigen « curing » Prozesses, sondern auch eine Umgestaltung der verfahrenstechnischen Durchführung bei der Herstellung von Schokoladeprodukten in Aussicht, wie bereits praktische Versuche gezeigt haben, was im Gesamten gesehen für die Schokolade-Industrie als Fortschritt zu werten ist.

RÉSUMÉ

EFFETS DU TRAITEMENT DES FÈVES FRAÎCHES DE CACAO PAR INFILTRATION SOUS VIDE DE CERTAINES SUBSTANCES

Le procédé de fermentation a pour but de développer dans les fèves de cacao les substances aromatiques désirées et de réduire l'âcreté des produits à base de cacao. Un grand nombre de transformations biochimiques accompagnant la fermentation sont basées sur des effets enzyma-

tiques d'échange. Nos essais nous ont permis de mettre en évidence la présence d'amylases, de protéases, de lipases, de phosphatases, de pectinestérases, de polygalacturonases, de catalase, de peroxydase, de polyphénoloxydase, d'aminoacide-décarboxylase, ainsi que du coenzyme A.

On a pu constater des actions combinées de caractère catalytique entre protéases-peptides, acides aminés et polyphénol-oxydases ainsi que des désaminations non enzymatiques des acides aminés avec formation de dérivés carbonylés aromatiques.

Des essais ont été exécutés par infiltration sous vide dans le but d'orienter les actions combinées enzymatiques dans les fèves de cacao, ou de les accélérer.

Les résultats des essais d'infiltration, exécutés avant la fermentation avec des fèves fraîchement récoltées, démontrent que des sels de cuivre comme co-facteur de la polyphénol-oxydase, des protéines, des hydrolysats de protéine et des mélanges d'amino-acides ont après une courte fermentation et dessiccation à température et de pH, contrôlés, une influence favorable sur la fermentation d'arômes dans les fèves de cacao.

Le procédé décrit d'infiltration sous vide en présence d'enzymes ou de composés catalysant les actions enzymatiques est un excellent exemple de l'efficacité des essais de fermentation de fèves de cacao, par procédé enzymatique, et particulièrement de la formation d'arômes. Ce procédé, constitue également une modification du procédé de « curing » pratiqué commercialement.

SUMMARY

ENZYMATIC PROCESSES IN CACAO BEANS DURING FERMENTATION UNDER VACUUM INFILTRATION

The process of curing cacao beans is carried out with the purpose of producing aroma substances and reducing the astringency of the beans. Many of the biochemical changes which occur during the process of curing most are enzymatic in nature. The presence of amylase, protease, lipase, phosphatase, pectinesterase, polygalacturonase, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, amino acid-decarboxylase, and coenzym A has been ascertained.

Combined action of protease and polyphenol-oxidase to form quinone peptide complexes has been suggested. The oxidation of polyphenols and their tie-up with proteins, peptides, or amino acids would, of course, account for the desired loss in astringency.

An attempt has been made to influence the course of such enzymatic changes, or to accelerate them by vacuum infiltration of cacao beans prior to fermentation by various enzymes or enzyme cofactors. Copper salts which provide copper as cofactor of polyphenol oxidase, protein, protein hydrolyzates, amino acid mixtures has been tried. These materials had a desirable effect and good chocolate could be produced from cacao which had undergone a shortened period of fermentation.

The principle of Vaccum infiltration with enzymes or with materials which affect enzyme action is an excellent example of the potential usefulness of enzymes in the study of cacao fermentations — and possibly in the commercial modification of the curing process.

LITERATUR

(1) Purr A., Springer R., Morcinek H., 1963. *Zeitschr. Lebensm.-Unters. u.-Forschung*, **123**, 102.

(2) Mohr W., 1970. *Fette-Seifen-Anstrichm.* **72**, 695.
Mohr W., Rohrle M., 1970. *Fette-Seifen-Anstrichm.*, **72**, 704.

(3) Purr A., 1960. *Zeitschr. Lebensm.-Unters. u.-Forschung*, **112**, 40.

(4) Altschul A. M., Karon M. L., Kyame L., 1948. *Arch. Biochem.*, **18**, 161.

(4*a*) Trautner E. M., Roberts E. A. H., 1950. *Austral. J. Sci. Res.* **3**, 356.

(5) Purr A., Morcinek H., Springer R., 1963. *Zeitschr. Lebensm.-Unters. u.-Forschung*, **123**, 341.

(6) Forsyth W. G., Quesnel V. C., Roberts J. B. 1958. *J. Sci. Food Agric.*, **9**, 181.

(7) Schubiger G. F., Roesch E., Egli R. H., 1957. *Fet'e-Seifen-Austrichm.* **59**, 631.

(8) Hess E. H., 1958. *Arch. Biochem.*, **74**, 198.

(9) Virtanen A. J., 1955. *Angew. Chemie*, **67**, 384.
(10) Hackmann R. H., Tood A. R., 1953. *Biochem. J.* **55**, 631.
Mason H. S., Peterson E. W., 1955. *J. Biol. Chem.*, **212**, 485.
Mason H. S., 1955. *Nature*, **175**, 711.
(11) Rusoff J. J., 1960. *U. S.-Patent* 2,835.590, May 20 (1958) u. U. S.-Patent 2,954,293, sept. 27.
(12) Schales O., Schales S. S., 1957. *Arch. Biochem.*, **69**, 378.
(13) Kornberg H. L., Beevers H., 1957. *Nature*, **180**, 35.
1957. *Biochem. Biophys. Acta* **26**, 531.
(14) Taufel K., Behnke U. 1959. *Ernährungsforschung*, **4**, 1.
(15) Schmalfuss H., Barthmeyer H., 1932. *Zeitschr. Lebensm.-Unters. u.-Forschung*, **63**, 283.
(16) Purr A., Helfenberger A., Nadai J. 1962. *Internat. Fachschr. f. d. Schokoladen-Industrie*, **17**, Nr. 8, Nr. 12, 534.
(17) Purr A., Helfenberger A., 1971. *Internat. Fachschr. f. d. Schokoladen-Industrie*, **26**, Nr. 2, 30. *Gordian* 1971. **71/10**, Heft 1656, 298.
(18) Allison H. W., Rohan T. A., 1958. *Reprint Tropical Agr.*, **35**, Nr. 4.
(19) Rohan T. A. « The Processing of Cocoa », *Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations*. Rom 1960, S. 59.
(20) Rohan T. A., Steward T., 1967. *J. Food Sci.*, **32**, 625.
Rohan T. A., 1967. *J. Food Sci.*, **32**, 402.
1969. *Food Processing Marketing* 12. January.
(21) Mohr W., 1958. *Fette-Seifen-Anstrichm.*, **60**, 661.
1967. **69**, 11.
Mohr W., Rohrle M., Severin Th., 1971. *Fette-Seifen-Anstrichm.*, **73**, 515.
(22) Herz W.-J., Schallenberger R. S., 1960. *Food Res.*, **25**, 491.
(23) Biehl B., 1955. *Gordian* **55**, 1321, 17.
Dissertation Universität Hamburg 1958.
1967. *Zeitschr. Lebensm.-Unters. u.-Forschung*, **133**, 145.
(24) Fincke A., 1965. Handbuch der Kakaoerzeugnisse, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin.

Ann. Technol. agric., 1972, **21**, (3), 473-486.

THE EFFECT OF IONIZING RADIATION ON ENZYMES

B. J. RADOLA and H. DELINCÉE

Institute of Radiation Technology,
Federal Research Center for Food Preservation,
D - 75 Karlsruhe, W. Germany

SUMMARY

The enzymological aspects of the effect of ionizing radiation on food have as yet received insufficient attention. For a number of food products the high residual activity of enzymes presents an obstacle to the technological application of irradiation due to undesired and uncontrolled post-irradiation effects. At present it is impossible to inactivate enzymes in food on irradiation at technologically fessible dose levels. The conbined use of a radiation and heat treatment appears to be a promising approach.

In order to gain a better inderstanding of the molecular processes on a radiation, heat and a combined treatment studies on model systems have been undertaken. The changes of the charge and size properties of horse-radish peroxidase have been studied by means of thin-layer isolectric focusing and thin-layer gel filtration. The isoelectric patterns were different on irradiation and heat treatment. Enzymatically active aggregates have been found on irradiation but not on heat treatment. While on a combined treatment a synergistic effect was obtained for the sequence irradiation followed by heating, an additive effect was found for the sequence heating and irradiation. Experiments with sarcoplasmic proteins from irradiated beef have shown that the inactivation processes proceed in a similar way *in situ*.

INTRODUCTION

The effect of ionizing radiation on enzymes has been the subject of intensive research since the beginning of the century, principally because of its radiobiological interest. The recognition of the potential of food preservation by application of ionizing radiation has focused interest also on the behaviour of enzymes in food irradiation. It has been early realized that enzymes could present a stumbling block to the application of food irradiation (1). Microorganisms can be effectively reduced oreliminated in a number of food products by a radiation treatment and microbiolo-

gically stable products can thus be obtained. On the contrary the endogenous enzyme systems remain active in irradiated foodstuffs even at the highest doses, which are microbiologically necessary and technologically feasible (2), (3). The high radiation resistance of enzymes in food results frequently in undesired and uncontrolled post-irradiation effects. The deleterious effect of enzymes on the organoleptic properties of food on storage (texture, colour, flavour, odour) presents a major unresolved technological problem.

Three main areas in food technology where the effects of ionizing radiation on enzymes have practical implications have been recently recognized by a Panel organized by the International Atomic Energy Agency (3).

A. — *The radiation treatement of enzyme preparations to eliminate contaminating microorganisms*

The radiation dose which is required to obtain sterile enzyme preparations will depend on the radiation resistance of the microorganisms to be eliminated. The practicability of producing sterile enzyme preparations for the food industry by application of ionizing radiation has been already demonstrated for pectic enzymes (4) and further progress with other enzymes can be expected in this field.

B. — *Treatement of high protein foods* (meat, fish, egg) *to extend storage life*

In Table I the different radiation treatments of high protein foods and some of the important enzymes involved are listed.

TABLE I

Radiation treatments and enzyme implications

Treatment	Dose	Enzyme implications
a. Radurization	0.1-0.5 Mrad	Fish : proteolytic enzymes
b. Radicidation.....	~ 0.5 Mrad	- - -
c. Radappertization ...	3-5 Mrad	Meat / Fish } proteolytic enzymes

Radurization is a radiation treatment aiming at prolonged storage life. For a number of food products it is possible to extend the storage life by a factor of two to four by applying low doses of radiation which cause no change in organoleptic quality. In radurized meats stored for weeks at chill temperatures the changes brought about by autolytic enzymes are not a problem (5). There are indications, however, that the considerably higher proteolytic activity of fish muscle will lead in radurized fresh fish to exudation of cellular fluids from the tissue, a process which is commercially undesirable (6).

Radicidation is a radiation process which aims to remove microorganisms significant in public health. Proposals for radicidation have hitherto concentrated on frozen or dried foods, the best known example being the removal of *Salmonella* from frozen eggs. Since the products treated by radicidation are stored in the frozen state, enzymic activity is inhibited and no practical problems arise due to endogenous enzymes (3).

Radappertization is defined as a radiation treatment which aims to produce a microbiologically stable food by destroying most, or ideally all, of the microorganisms in the food. Even at the highest dose necessary to achieve this purpose, autolytic enzymes remain active and will degrade the irradiated product on subsequent storage. The products of the greatest interest for radappertization are meat and fish. Direct comparison of autolysis in irradiated meat with that in the untreated material is difficult due to interference from bacterial spoilage. In experiments based on the determination of TCA—soluble nitrogen it was found, that after storage for 90 days at 37°C meat sterilized by irradiation with 5 Mrad still contained 80 p. 100 of the proteolytic activity of the untreated material, which was kept sterile by aseptic techniques (7). Insufficient inactivation of proteolytic enzymes results in an almost complete destruction of the sarcoplasmic proteins in meat during storage for 6 months at 37°C and is paralleled by partial denaturation of the structural proteins (8). At lower temperatures these degradations are less severe but are still accompanied by a loss in organoleptic quality. Irradiation of thawed cod muscle with doses up to 10 Mrad did not significantly affect the proteolytic activity of this tissue (6).

It has been postulated already in one of the first studies on radappertization of meat that for adequate enzyme inactivation a radiation dose 5-10 fold of that necessary to inhibit spore-forming bacteria might be required (1). The use of these high doses would inevitably lead to products of unacceptable organoleptic quality. Even at extremely high doses of radiation still appreciable amounts of enzyme activity are observed. In lambs liver 50 p. 100 of the proteolytic activity remains active after a dose of 3 Mrad and 15 p. 100 of residual activity are observed after application of a dose of 40 Mrad (9). Phospholipases of lambs liver were half inactivated at 10 Mrad and the esterases at 20 Mrad (9). With both enzymes the effect of radiation tailed off at higher dose levels. In spite of the very incomplete inactivation of the lipases, lipid hydrolysis is of little practical importance and the appearance of free fatty acids does not seriously contribute to off-flavour of irradiated meat on storage (8).

C. — *Treatement of fruits and vegetables to extend storage life by delaying maturation or preventing fungal rotting*

In irradiated fruits and vegetables a distortion of the physiological processes in the post-irradiation period is observed. At the rather low radiation doses used with this products an immediate damage of enzymes seems to be unprobable, the differences of enzymes activity being basically due to secondary effects. Different enzymes have been studied in fruits following irradiation. An increase of activity was noted for some enzymes, while a decrease was observed for other. The physiological significance of these radiation-induced changes of enzyme activity is unknown (10).

It is apparent from this survey that for a number of food products application of a radiation treatment will depend on an effective post-irradiation control of enzyme activity. Since enzymes cannot be inactivated by ionizing radiation alone a number of methods has been suggested for their inactivation in combination with a radiation treatment. A physiological pH can be maintained in meat by the injection of adrenalin into the animals before slaughter (11). *Post mortem* anaerobic glycolysis is eliminated by this treatment and the resulting high pH reduces strongly the rate of proteolysis but not to an extent warranting long-term storage at high temperature. This process has the obvious disadvantage of using a physiologically active substance which is difficult to control and which varies in response. In some meats the adrenalin treatment results in a dark colour (8). Little success can be expected from a chemical inhibition of the autolytic enzymes due to their great difference in structure, mode of action and radiation response. Radiosensitization of enzymes in food has been repeatedly suggested as an approach to enzyme inactivation but a practical realization of this proposal is lacking (3). Heating is still the best method for enzyme inactivation in food processing and a combination of a comparatively light heat treatment with irradiation holds the most promise for a successful enzyme control at practical radiation dose levels (3).

Little is known on the mechanism of enzyme inactivation by a combined radiation and heat treatment. Determination of total enzyme activity provides only a very limited insight into the molecular processes of enzyme inactivation. Most enzymes in food occur as mixtures of isoenzymes which could show different inactivation characteristics on a radiation and heat treatment. The residual enzyme activity observed following a radiation or heat treatment could thus result from resistant isoenzymes. Since the complexity of food will render the interpretation of the results at the molecular level difficult, we have started studies with a model system (12), (13). For a number of reasons we have chosen peroxidase as the model substance. Commercial preparations of horseradish peroxidase (Boehringer, Mannheim, W. Germany) consist of a mixture of isoenzymes with isoelectric points distributed over a wide pH range (14). Individual isoenzymes can be isolated from this mixture by a combination of different fractionation procedures (15), (16) and the inactivation of the isolated isoenzymes could thus be studied in addition to the inactivation of the whole isoenzyme mixture. Peroxidase is present in many foods and residual activity of this enzyme is thought to be involved in off-flavour in processed food on storage (17), (18).

METHODS

In our experiments we have used two relatively simple techniques : thin-layer isoelectric focusing (19) and thin-layer gel filtration (20). Application of these techniques provides an information on two important parameters of enzymes : the isoelectric point and the molecular size. Briefly, isoelectric focusing is performed on 20 × 20 cm glass plates coated with a gel suspension of Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia, Uppsala, Sweden) containing 1 p. 100 of carrier ampholytes (L. K. B., Stockholm, Sweden). When a voltage of direct current is applied to the plate the carrier ampholytes migrate according to their isoelectric points either to the anode

or to the cathode, and build up a stable pH gradient. Proteins or enzymes migrate in this pH gradient till they reach a region corresponding to their isoelectric point and are focused at this particular pH. After completion of the run the proteins are localized by the print technique. A paper which is rolled into the gel layer, removes the liquid phase with the separated proteins ; it is subsequently dried and stained with one of the conventionel protein dyes. Enzyme activity is detected by a substrate-impregnated paper containing a suitable buffer with a pH optimal for the enzyme reaction. In thin-layer gel filtration a separation according to differences in molecular size is achieved on plates coated with a gel of suitable porosity e.g. Sephadex G -200 Superfine. The plates are inclined and a flow of a buffered salt solution is established. In this system the bigger proteins migrate more rapidly than the smaller ones. Detection of proteins and of enzyme activity is performed also by the print technique.

RESULTS

A. — *Irradiation of peroxidase*

Tin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes demonstrated that the isoelectric pattern of horse-radish peroxidase, irradiated as a 1 p. 100 solution in phosphate buffer, is extensively modified after irradiation in the dose range 0.5-2 Mrad

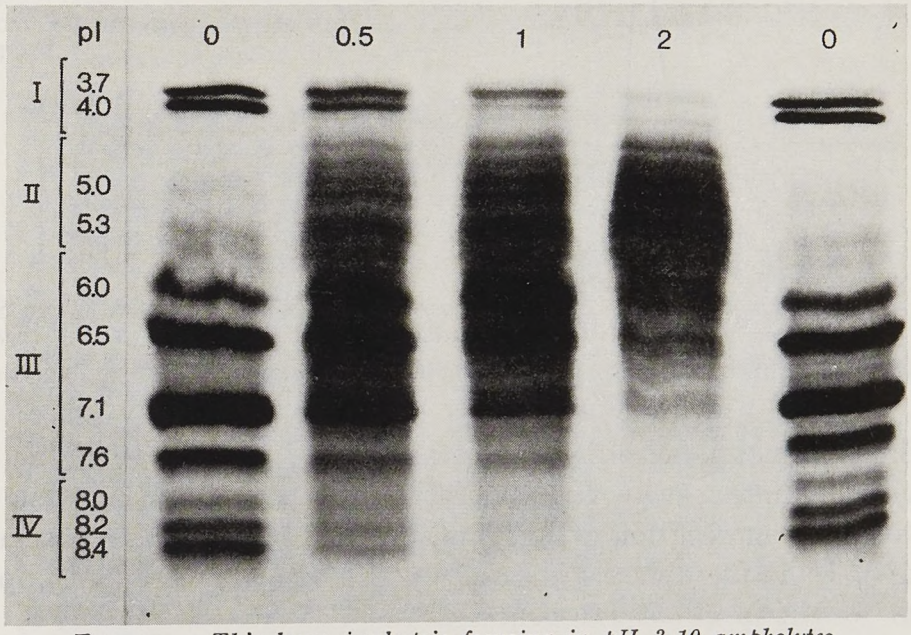


FIG. 1. — *Thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes of irradiated horseradish peroxidase*

Dosis in Mrad. Plate : 20 cm × 20 cm, coated with a 0.75 mm layer of a Sephadex G-75 Superfine suspension, containing 1 p. 100 of carrier ampholytes. Focusing at 10 V/cm for 7 h at 4-6°C. For enzyme detection a print was taken, with a buffered (0,3 M citrate — 0,6 M phosphate buffer pH 50). paper, impregnated with 1 p. 100 urea-peroxide and o-toluidine in methanol. Equal sample volumes were applied.

(Fig. 1). Already at the lowest dose, namely 0.5 Mrad, distinct qualitative and quantitative changes could be observed. In the pH 4-6 range multiple enzyme zones appeared which in the unirradiated control were absent or apparent only in much

smaller amounts. A quantitative change in the distribution of the *p*I 6.0, 6.5 and 7.1 isoenzymes became evident. The amount of the *p*I 7.1 isoenzyme, which is the main component of the control, markedly decreased, whereas that of the *p*I 6.0 isoenzyme increased. At 1 and 2 Mrad a further increase in the amount of the *p*I 4-6 isoenzymes was observed, accompanied by a decrease of the *p*I 6.5 and 7.1 isoenzymes. A comparison of the patterns over the whole irradiation range revealed that the isoenzymes with the highest *p*I disappear with increasing dose. Also, only small amounts of the most acidic isoenzymes remained at the highest dose (2 Mrad).
Thin-layer gel filtration on Sephadex *G-200* revealed enzymatically active aggregates (Fig. 2). Enzyme activity was essentially paralleled by protein staining with Amido

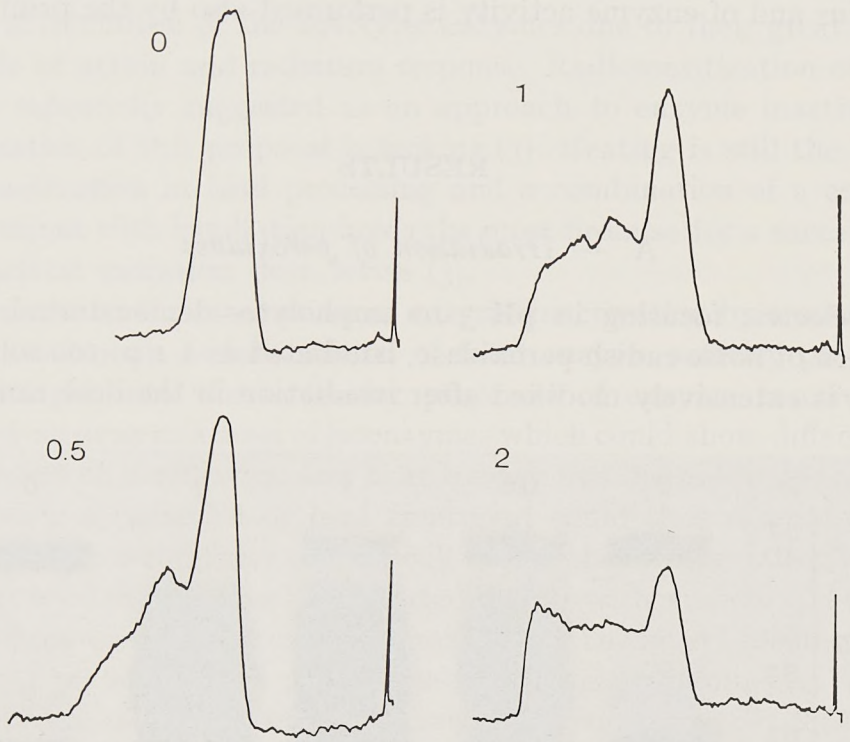


FIG. 2. — *Densitograms (reflectance) of thin-layer gel filtration on Sephadex G-200 Superfine of horseradish peroxidase unirradiated and irradiated with* 0,5, 1 *and* 2 *Mrad*
The peak to the right corresponds to the starting line. Equal sample volumes. Enzyme staining.

Black 10 B. With increasing dose the amount of the aggregated active enzyme increased, while simultaneously the amount of the monomeric enzyme decreased. Radiation-induced aggregation of horseradish peroxidase probably proceeds through an enzymatically active dimer, indicated by the appearance of a component with a molecular weight of about 100 000.

The monomer, dimer and higher aggregates of irradiated peroxidase were isolated by preparative gel filtration. Thin-layer isoelectric focusing of the isolated fractions revealed striking differences in the isoelectric patterns (Fig. 3). The dimer and the aggregates exhibited a very similar pattern with little resemblance to the pattern of the control. They consisted of multiple enzyme zones with isoelectric points in the pH 4-6 range with traces of the most acidic isoenzymes and with only small amounts of the *p*I 6.0 and 6.5 isoenzymes ; the *p*I 7.1 and more basic isoenzymes were virtually absent. The isoelectric pattern of the monomer contained most isoenzymes present also in the unirradiated control. Changes in the quantitative dis-

tribution of the *p*I 6.0, 6.5 and 7.1 isoenzymes were clearly evident. Residual amounts of the most acidic and most basic enzymes were still detected in the monomer and in addition, multiple enzyme zones in the pH 4-6 range could also be observed. Comparison of the isolated monomers, dimers and aggregates of peroxidase irradiated

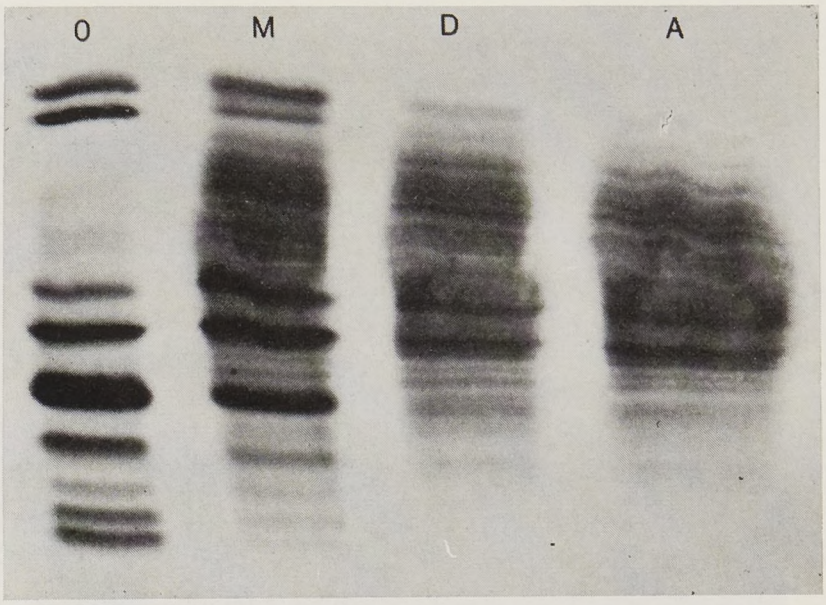


FIG. 3. — *Thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes of horseradish peroxidase irradiated with 1 Mrad. Anode at the top*

O — unirrradiated control, M — monomer, D — dimer, A — higher aggregates. M, D, A were isolated by preparative gel filtration after irradiation. Enzyme staining. Equal amounts of peroxidase activity were applied.

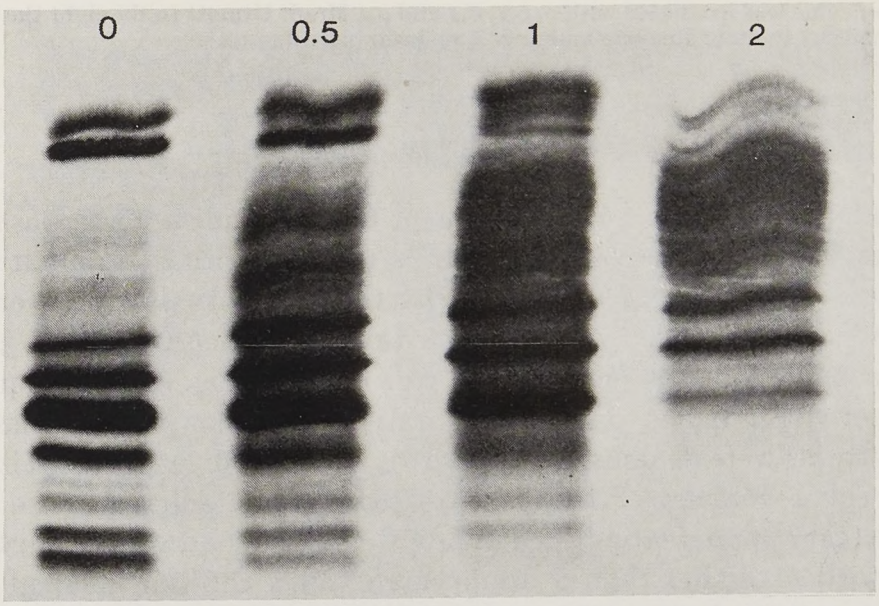


FIG. 4. — *Thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes of the monomers, isolated by preparative gel filtration of irradiated horseradish peroxidase.*

Dosis in Mrad. Anode at the top. Enzyme staining. Equal amounts of peroxidase activity were applied

with 0.5, 1 and 2 Mrad has shown that with increasing dose in the isoelectric pattern of the dimers and aggregates the active zones accumulate in the pH range 4-6. Also the monomeric enzyme was considerably modified with increasing dose (Fig. 4). The basic isoenzymes disappeared, and increasing amounts of the *p*I 4-6 components

were produced. On irradiation of isolated peroxidase isoenzymes (*p*I 6.5 and 7.1) we observed in thin-layer isoelectric focusing a shift to components with low isoelectric points and at a sufficiently high dose of radiation most of the activity accumulated in the pH 4-6 range (Fig. 5). The experiments with the isolated isoenzymes thus basically confirmed the results with the whole isoenzyme mixture.

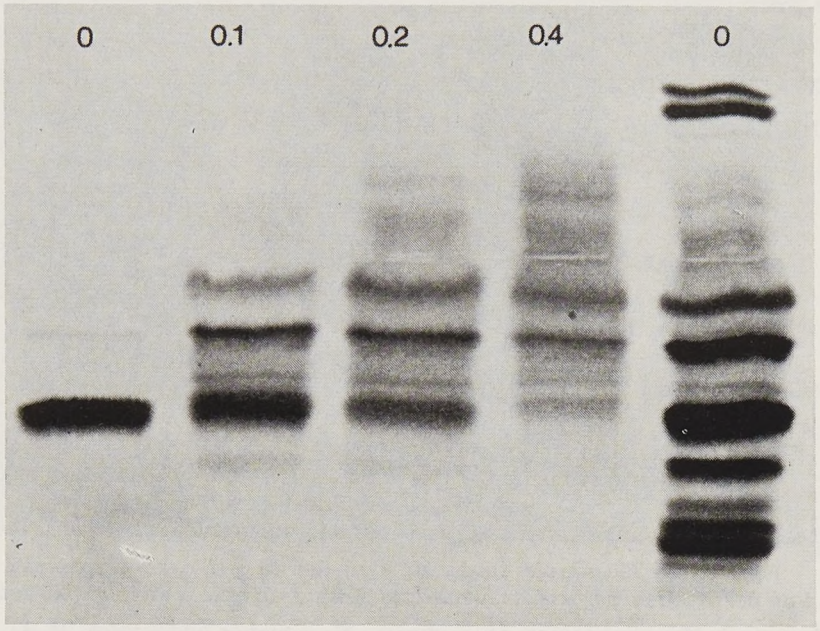


FIG. 5. — *Thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes of the pI 7,1 isoenzyme of horseradish peroxidase*

The isolated isoenzyme was irradiated with 0, 0,1, 0,2 and 0,4 Mrad. Utmost to the right the unfractionated control. Anode at the top. Enzyme staining. Equal sample volumes.

B. — *Heat treatement of peroxidase*

The results obtained on a heat treatment of horse-radish peroxidase were different from those obtained on irradiation. In agreement with determinations of total peroxidase activity in the heated samples with the guaiacol assay, an overall decrease of enzyme staining was noted by thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes, when equal volumes of the samples were applied (Fig. 6). With equal amounts of enzyme activity applied, distinct qualitative and quantitative changes in the isoelectric patterns were demonstrated (Fig. 7), which were less evident in the experiments with equal volumes of the heat-treated enzyme solution. The most basic isoenzymes became preferentially inactivated, and after 40 min at 90°C nearly all isoenzymes with *p*I higher than 8 disappeared. With the near-neutral isoenzymes which comprise most of the activity of the untreated sample, quantitative changes resulting in an increase of isoenzymes with lower isoelectric points were observed. Already after 5 min heating the amount of the *p*I 6.0 isoenzyme increased and after heating for 40 min the amount of this isoenzyme exceeded that of the pI 7.1 isoenzyme, the predominant isoenzyme of the untreated sample. The most acidic isoenzymes showed a relatively high heat resistance and their relative content increased with increasing time of the heat treatment.

By thin-layer gel filtration of the heat-treated peroxidase only small amounts

of enzymatically active aggregates were found in addition to the remaining monomer (Fig. 8). When the print was stained with Amido Black 10 B rather than for enzyme activity, large amounts of high molecular aggregates (> 500 000) were observed (Fig. 9)

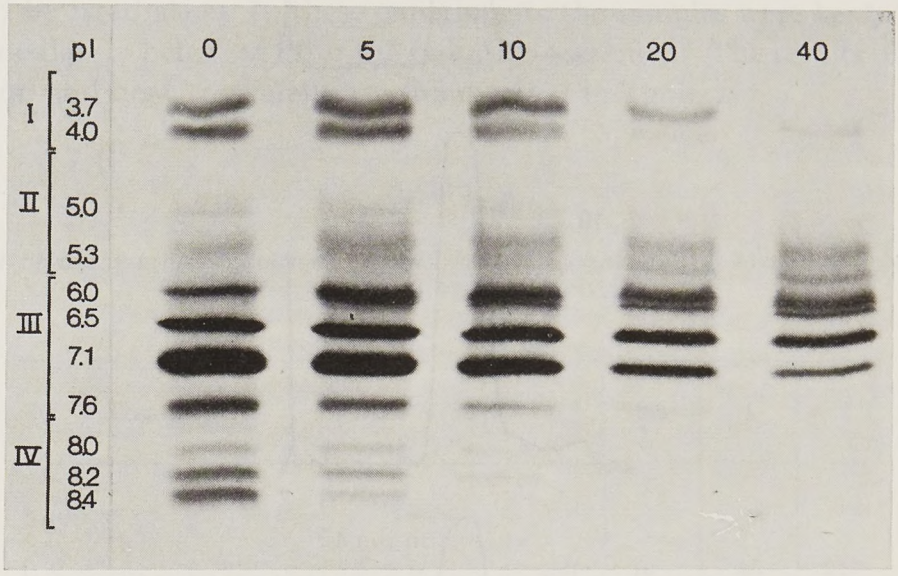


FIG. 6. — *Thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes of heat-treated horseradish peroxidase*

Heating time at 90°C/min. Enzyme staining. Equal sample volumes

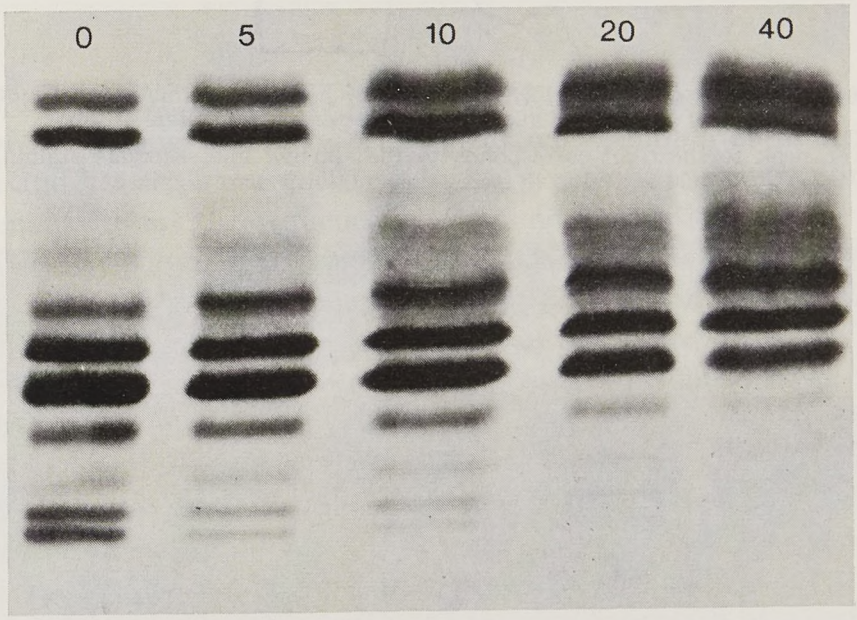


FIG. 7. — *Thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes of heat-treated horseradish peroxidase*

Heating time at 90°C/min. Enzyme staining. Equal amounts of peroxidase activity applied.

With prolonged heating the ratio of aggregates to the residual monomeric protein increased. After 10 min the amount of monomer roughly equaled that of the aggregates.

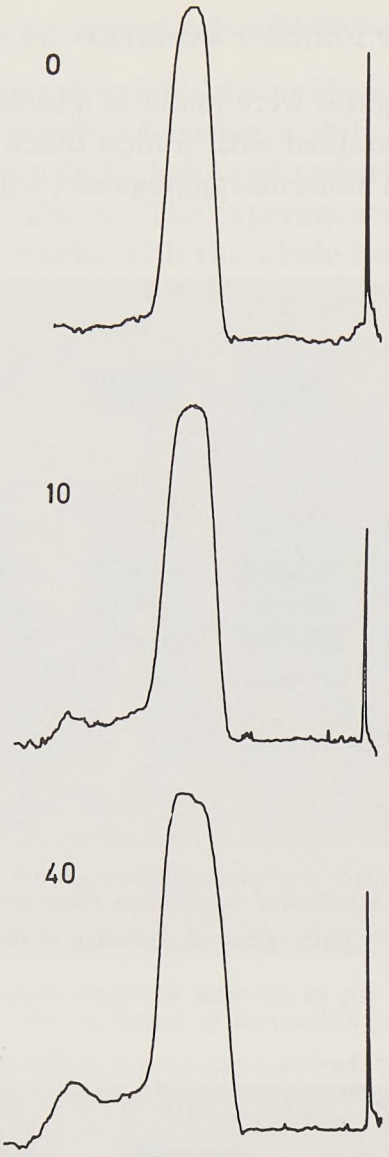


FIG. 8. — *Densitograms* (reflectance) *of thin-layer gel filtration on Sephadex G-200 Superfine of heat-treated* (90°C/min) *horseradish peroxidase*

The peak to the right corresponds to the starting line. Enzyme staining. Equal amounts of peroxidase activity were applied

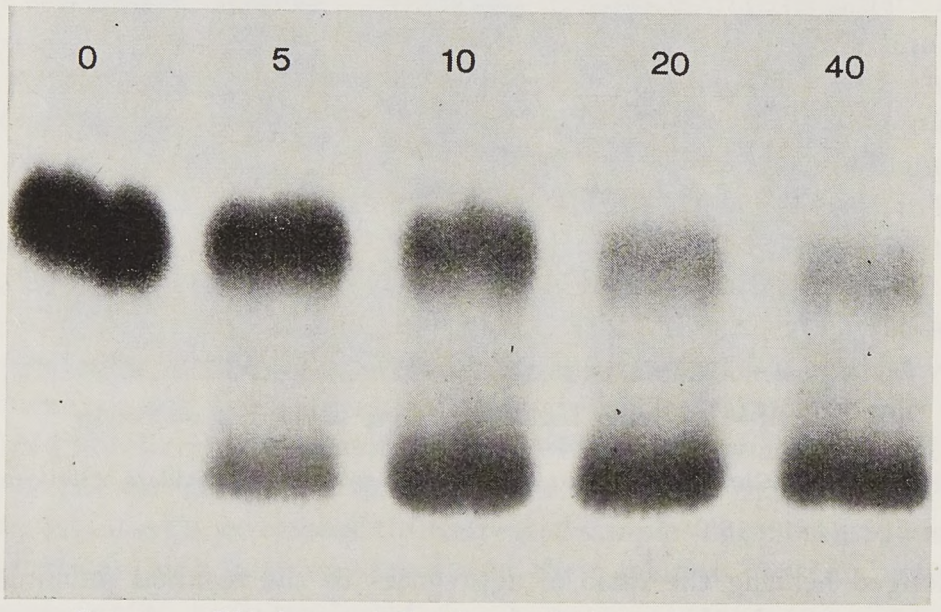


FIG. 9. — *Thin-layer gel filtration on Sephadex G-200 Superfine of heat-treated* (90°C/min) *horseradish peroxidase*

Protein staining with Amidoblack 10 B. Equal sample volumes

C. — *Effect of a combined radiation and heat treatment*

In experiments on the effect of a combined radiation and heat treatment the sequence irradiation and heating was compared with the reversed sequence — heating followed by irradiation. In these experiments the samples were heated for 5 min. at 90°C immediately before or after the radiation treatment. The results of the combined radiation and heat treatment are summarized in Table 2.

TABLE 2

The effect of a combined radiation (γ) *and heat* (Q) *treatment of horseradish peroxidase*
Percentage of residual activity

Treatment	Dose Mrad	0	0.5	1	2
	Heating 5 min at 90°C				
1. γ	0	100	70	46	21
2. γ + Q (calculated) . .	5	57	40	26	12
3. (Q + γ)	5		40	24	13
4. (γ + Q)	5		11	4	0.5
5. $F = \frac{\gamma + Q}{\gamma + Q}$			3.6	6	24

The first horizontal line shows the values of residual activity after irradiation. The values of the second line have been calculated assuming an additive action of the radiation and heat treatment. The values of the third and fourth line have been found experimentally for the sequence heating and irradiation and for the reversed sequence. It is clearly evident that irradiation followed by heating is much more efficient than the reversed sequence. The ratio F in the table indicates that the synergistic effect increases with increasing dose of radiation.

The isoelectric patterns of peroxidase following a combined treatment showed that again the most basic isoenzymes were preferentially inactivated. With the group of near-neutral isoenzymes quantitative changes resulting in an increase of isoenzymes with lower isoelectric points were observed. New enzymatically active components were observed in the pH 4-6 range. Only traces of activity could be demonstrated in samples irradiated with 2 Mrad and then heated for 5 min at 90°C. The results of isoelectric focusing indicate that on application of a combined treatment for the sequence heating and irradiation enzymatically active aggregates accumulate, whereas for the reversed sequence the radiation-induced aggregates are inactivated on heat treatment. Thin-layer gel filtration of the peroxidase after a combined treatment confirmed these results. The ratio of enzymatically active aggregates to the active monomer was approximately 1 : 1 after irradiation with 2 Mrad and 1 : 3 after heating for 5 minutes at 90°C followed by irradiation with the same dose.

D. — *Concluding remarks*

On irradiation of peroxidase a population of damaged, modified and unaltered molecules is obtained. The changes of the charge properties, as revealed by thin-layer isoelectric focusing, clearly demonstrate that one of the possible mechanisms of the radiation inactivation of peroxidase involves a sequence of radiolytic degradations which results in components with altered isoelectric points. This mechanism of inactivation is well illustrated by the isoelectric patterns of the monomers isolated from the mixed population of modified and unaltered molecules after irradiation. Radiolysis of basic amino acids (21), splitting of labile amide groups (22) and deamination (23) could all contribute to the observed effects. The radiolytic degradation of the most acidic isoenzymes probably involves other reactions. Splitting of acetic and propionic acid, as already found on irradiation of other proteins (24), could well account for the observed results. The experiments with isolated isoenzymes confirmed the results obtained with the isoenzyme mixture and demonstrated the same sequence of radiolytic degradations for the single components.

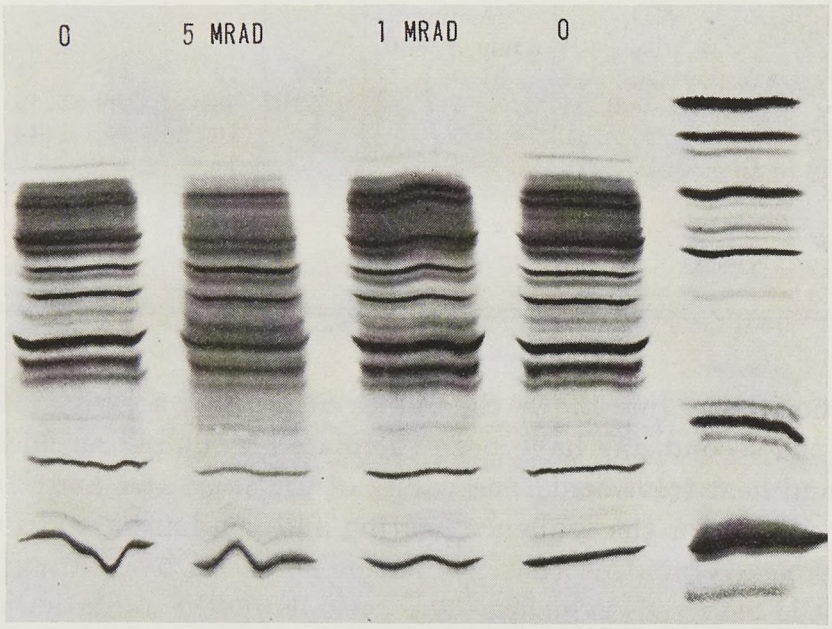


FIG. 10. — *Thin-layer isoelectric focusing in pH 3-10 ampholytes of beef sarcoplasmic proteins from untreated and irradiated meat.*

Utmost to the right pH-marker proteins (from top to bottom) : cytochrome *c*, ribonuclease, sperm whale myoglobin, horse myoglobin, conalbumin, human serum albumin, ferritin, Protein staining with Coomassie Blue G 250.

In addition to the radiolytic degradation of the monomers, aggregation was found to be another mechanism of radiation-induced inactivation. These results are in agreement with previous findings (25), (26), (27). With increasing dose of radiation increasing amounts of the enzyme aggregated. The radiation-induced aggregates were in part enzymatically active and differed in a number of physico-chemical properties from the monomers. Their technologically most important property is their high heat-lability. For the combined radiation and heat treatment a strongly synergistic effect (Table 2) was observed which to a great extent is attributable to the heat lability of the radiation-induced aggregates. Thin-layer isoelectric focusing revealed

dose-dependent changes of the monomers, which in part contribute also to the synergistic effect.

The inactivation of enzymes in food differs in many respects from the inactivation in the simple, well defined system described above. In a series of experiments with irradiated meat it was found, however, that the discussed mechanisms of inactivation apply also to physico-chemically more complicated systems. A radiation-induced sarcoplasmic protein fraction was demonstrated in meat irradiated with 5 Mrad (28), (29). The amount of this fraction was found to depend on dose. Evidence was obtained that this radiation-induced fraction consists of aggregated sarcoplasmic proteins. Thin-layer isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins from meat irradiated with 1 and 5 Mrad revealed a distinct decrease of the most basic proteins (Fig. 10). For meat peroxidases a shift towards components with lower isoelectric points was observed (29), which is in good agreement with the results on irradiation of horseradish peroxidase. It thus appears that both mechanisms of enzyme inactivation described for the model system of peroxidase operate also on food irradiation. A continuation of these studies on the combined effect of a radiation and heat treatment could thus provide a basis for a more effective control of the undesired enzyme activity on irradiated food.

RÉSUMÉ

EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES ENZYMES

Les aspects enzymatiques de l'action des radiations ionisantes sur les aliments ont été étudiés insuffisamment jusqu'à présent. L'activité enzymatique résiduelle de nombreux produits empêche l'application d'une irradiation. Cette activité provoquerait des modifications indésirables et difficilement contrôlables de leurs propriétés organoleptiques. A présent il est impossible d'inactiver les enzymes des aliments par l'application de radiations ionisantes à des doses technologiquement valabes. Par contre, l'irradiation combinée avec un traitement thermique permet d'envisager une alternative prometteuse.

Pour avoir une idée des processus moléculaires intervenants au cours de l'irradiation, du traitement thermique et d'un traitement combiné, nous avons procédé à des expériences avec des systèmes modèles. Une étude des changements des propriétés de charge et de la grosseur des molécules a été réalisée en prenant comme modèle un mélange d'isoenzymes de peroxydase du raifort. Des recherches ont fait appel aux techniques de focalisation isoélectrique et de filtration sur gel en couches minces.

Les résultats de la focalisation isoélectrique et de la filtration sur gel étaient différents dans le cas de l'irradiation et du traitement thermique. On a pu mettre en évidence des agrégats enzymatiques actifs par l'irradiation, qu'on ne pouvait pas déceler sous l'influence thermique. En combinant les deux traitements, c'est-à-dire en faisant suivre le traitement par irradiation d'un traitement thermique, on observait une action synergique, alors qu'en faisant suivre l'irradiation d'un traitement thermique on n'observait qu'une action additive. Des essais réalisés avec des protéines sarcoplasmatiques d'une viande irradiée ont permis de constater que les processus d'inactivation se déroulent de façon semblable *in situ*.

ZUSAMMENFASSUNG

EINWIRKUNG IONISIERENDER STRAHLEN AUF ENZYME

Die enzymologischen Aspekte der Einwirkung ionisierender Strahlen auf Lebensmittel sind bisher nur unzureichend untersucht worden. Einer technologischen Anwendung der Bestrahlung steht bei vielen Produkten die hohe Restaktivität der Enzyme im Wege, die bei der Lagerung

unerwünschte und schwer kontrollierbare Veränderungen der organoleptischen Eigenschaften hervorrufen. Es ist derzeit unmöglich Enzyme in Lebensmitteln bei Anwendung technologisch vertretbarer Strahlendosen zu inaktivieren. Eine aussichtsreiche Alternativmethode stellt jedoch der kombinierte Einsatz einer Bestrahlung und Hitzebehandlung dar.

Um einen Einblick in die molekularen Prozesse bei der Strahlen - und Hitzebehandlung sowie beim Einsatz der kombinierten Behandlung zu gewinnen, wurden Untersuchungen an Modellsystemen durchgeführt. Die Veränderungen der Ladungseigenschaften und der Molekülgrösse wurden am Beispiel eines Isoenzymgemisches der Meerrettich-Peroxidase mit Hilfe der dünnschicht-isoelektrischen Fokussierung und der Dünnschicht-Gelfiltration untersucht. Die isoelektrischen Muster waren verschieden bei der Bestrahlung und bei der Hitzebehandlung. Enzymatisch aktive Aggregate wurden bei der Bestrahlung, nicht jedoch bei der Hitzebehandlung nachgewiesen. Bei der kombinierten Behandlung zeigte die Reihenfolge Bestrahlung und Hitzebehandlung eine synergistische, die Reihenfolge Hitzebehandlung und Bestrahlung nur eine additive Wirkung. Versuche mit Sarkoplasma-Proteinen aus bestrahltem Fleisch zeigten, dass die Inaktivierungsprozesse *in situ* ähnlich verlaufen.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Proctor B. E., Goldblith S. A., 1951. *Food Technol.*, **5**, 376.

(2) Vas K., 1966. In Food Irradiation. *Proc. Symp. 6-10 juni 1966, Karlsruhe. I. A. E. A., Wien*, p. 253.

(3) Enzymological aspects of food irradiation. 1969. *Proc. Panel 8-12 April 1968, Wien. I. A. E. A.* Wien.

(4) Vas K., *Proc First Int. Congr. Food Sci. and Technol.*, London, 1962. Gordon and Bread, New York, 1965, p. 29.

(5) Rhodes D. N., Shepherd H. J., 1966. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 287.

(6) Siebert G., Musch K., in Enzymological aspects of food irradiation. *Proc. Panel* 8-12. *april 1968, Wien. I. A. E. A., Wien, 1969.*

(7) Lawrie R. A., Sharp J. G., Bendall J. R., Coleby B., 1961. *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 742.

(8) Rhodes D. N., in Enzymological aspects of food irradiation. *Proc. Panel 8-12 April* 1968, *Wien. I. A. E. A.*, 1969.

(9) Rhodes D. N., Meegungwan C., 1962. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 279.

(10) Drawert F., Emberger R., Westphal N., Rolle K., Tressl R., 1971. Euratomreport EUR 4617 *d. Commission of the European Communities.*

(11) Radouco-Thomas C., Lastate-Dorolle C., Zender R., Busset R., Meyer H. M., Mouton R. F., 1959. *Food Res.*, **24**, 453.

(12) Delincée H., Radola B. J., Drawert F., 1971. *Int. J. Radiat. Biol.*, **19**, 93.

(13) Delincée H., Radola B. J., Drawert F., 1971. *Experientia*, **27**, 1265.

(14) Delincée H., Radola B. J., 1970. *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 404.

(15) Delincée H., Radola B. J., in Protides of Biological Fluids, *Proc. 18 th Colloq.*, 1970, Brugge Pergamon, Oxford, 1971, p. 493.

(16) Delincée H., Radola B. J., in preparation.

(17) Guyer R. B., Holmquist J. W., 1954. *Food Technol.*, **8**, 547.

(18) Esselen W. B., Anderson E. E., 1956. *Food Res.*, **21**, 322.

(19) Radola B. J., 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 335.

(20) Radola B. J., 1968. *J. Chromatogr.*, **38**, 61.

(21) Liebster J., Kopoldova J., 1964. *Advan. Radiat. Biol.*, **1**, 157.

(22) Robinson A. B., McKerrow J. H., Cary P., 1970. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **66**. 753.

(23) Simic M., Hayon E., 1971. *Radiat. Res.*, **48**, 244.

(24) Friedberg F., Riesz P., 1970. *Radiat. Res.*, **42**, 446.

(25) Shapira R., 1963. *Int. J. Radiat. Biol.*, **7**, 537.

(26) Jung H., Schüssler H., 1966. *Z. Naturforsch.*, **21** *b*, 224.

(27) Haskill J. S., Hunt J. W., 1967. *Radiat. Res.*, **31**, 327.

(28) Radola B. J., 1969. *Kältetechnik-Klimatisierung*, **21**, 323.

(29) Radola B. J., in The identification of irradiated foodstuffs. *Proc. Colloq.*, 1970, Luxembourg. Commission of the European Communities.

annales de technologie agricole

Compte-rendu des travaux du XIIIe symposium de la Commission Internationale des Industries Agricoles et Alimentaires

PARIS, Février 1972

"L'emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires"

2ème Partie

Trimestriel

1972

Vol. 21 . N°4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 487-499.

RÉACTIONS ENZYMATIQUES EN MILIEU PEU HYDRATÉ

R. DRAPRON

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., 91 - Massy (France)

RÉSUMÉ

Les observations faites sur les transformations enzymatiques dans les milieux naturels peu hydratés portent dans certains cas sur l'activité de multi-systèmes enzymatiques ; aussi ne permettent-elles guère de préciser l'évolution de l'activité ou la cinétique de l'action de ces enzymes en fonction de l'hydratation, que l'eau intervienne comme réactant (hydrolyse), ou de toute autre manière. C'est pourquoi plusieurs chercheurs ont été amenés à étudier les manifestations enzymatiques dans des mélanges artificiels modèles « enzyme-substrat » en fonction de l'activité de l'eau du milieu, ce paramètre permettant de connaître le degré de liberté de l'eau dans le système et d'aboutir à une compréhension plus claire des phénomènes observés.

C'est ainsi que les résultats obtenus, dans la plupart des cas avec des hydrolases (amylases, lipases, phospholipases et phytases), ont montré que les actions enzymatiques en milieux peu hydratés présentent en général des évolutions très différentes de celles qui sont observées en solution ou en dispersion aqueuse, ainsi que le rôle prépondérant de l'état de l'eau sur ces évolutions et la possibilité de prévoir ces dernières à partir des isothermes de sorption.

INTRODUCTION

De nombreuses transformations peuvent se produire dans les produits alimentaires selon les conditions auxquelles ils sont soumis et, dans les produits solides ou pâteux, la teneur en eau joue un rôle prédominant dans le déroulement des processus. Ainsi, il est apparu depuis longtemps que le déclenchement et l'intensité des phénomènes vitaux sont sous la dépendance de l'humidité du milieu ; tel est le cas pour le développement des micro-organismes, la respiration, la germination, et d'une façon générale pour les activités enzymatiques.

Dans les milieux naturels, il n'est généralement pas aisé de distinguer le rôle respectif des différentes causes de modifications. Cependant, en se protégeant au mieux contre les actions d'ordre microbiologique ou chimique, on peut observer l'évolution d'actions enzymatiques typiques. Ceci est réalisable, surtout lorsque

les produits terminaux de la réaction peuvent être dosés spécifiquement dans les milieux complexes, mais le cas est exceptionnel.

Les enzymes impliquées peuvent être des composants normaux du matériel biologique considéré ou avoir été précédemment sécrétées par des micro-organismes contaminant le milieu ou volontairement ajoutés.

Au cours des traitements technologiques, la manifestation de l'activité enzymatique peut résulter d'une lésion de la structure cellulaire qui met au contact l'enzyme avec son substrat ; c'est ce que l'on observe avec les céréales broyées. Dans d'autres cas, l'enzyme est mise en présence de son substrat lors d'un mélange : l'addition de matières grasses à des farines de céréales contenant des lipases en est un exemple.

De plus, l'évolution de ces activités enzymatiques peut ne se produire que très lentement au cours d'un stockage, lorsque les conditions sont peu favorables, ou lorsque la concentration de l'enzyme est faible.

Pour ces différentes raisons, les observations globales faites en milieu naturel, portant dans de nombreux cas sur l'activité de multi-systèmes enzymatiques, ne permettent guère de préciser l'évolution ou la cinétique des réactions en fonction de l'hydratation, que l'eau intervienne comme réactant, ce qui est le cas pour une hydrolyse, ou de toute autre manière, et il est difficile d'en déduire des lois générales.

C'est pourquoi plusieurs chercheurs ont été amenés à étudier, en fonction de l'humidité relative, les manifestations enzymatiques dans des mélanges artificiels modèles « enzyme-substrat ».

De telles études ont surtout été effectuées sur des hydrolases, protéinases (Volgunov, 1948 ; Volgunov et Pokhno, 1949), amylases (Mashkovcev, Volgunov et Pokhno, 1951 ; Kiermeier et Coduro, 1954 ; Drapron et Guilbot, 1962), estérases, telles que phospholipases (Acker et Luck, 1958 ; Acker et Kaiser, 1959), lipase (Rothe, 1958 ; Acker et Beutler, 1965) et phytase (Acker et Beutler, 1963).

Cependant, quelques recherches ont été entreprises sur d'autres enzymes par Linko (1960) et Purr (1970) qui ont examiné le cas de quelques oxydo-réductases.

C'est à partir de l'ensemble des résultats obtenus que nous allons dégager un certain nombre de règles générales concernant les modalités d'action des enzymes dans ces mélanges modèles, après avoir défini l'état de l'eau dans de tels milieux.

CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT DE L'EAU DANS LES MILIEUX PEU HYDRATÉS

Il est apparu en effet que, seule, la connaissance du degré de liberté de l'eau dans le milieu est susceptible d'aboutir à une compréhension plus claire des phénomènes observés.

De manière classique, on relie, pour une température donnée, la teneur en eau d'un produit à l'humidité relative avec laquelle celui-ci est en équilibre. L'isotherme de sorption ainsi obtenu présente une allure sigmoïde (fig. 1).

Rappelons que l'humidité relative correspond, à une température T, au rapport de la pression de vapeur d'eau p (en équilibre avec la substance) à la pression de vapeur saturante p_0 $\left(\mathrm{HR} = \frac{p}{p_0}\right)$. Cette humidité relative d'équilibre caractérise

l'*activité de l'eau* dans le système, l'eau libre ayant par définition un coefficient d'activité égal à 1, équivalent à une humidité relative de 100 p. 100.

La forme sigmoïde de la courbe de sorption est généralement interprétée comme

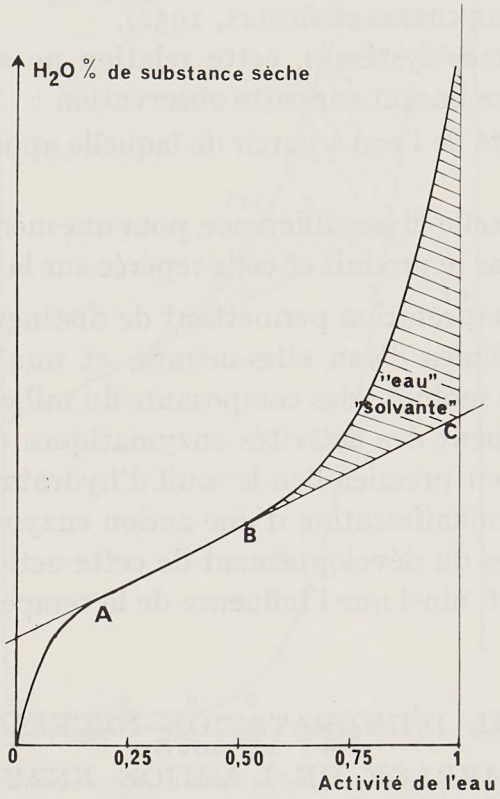


FIG. 1. — *Représentation schématique d'une courbe de sorption*

traduisant le recouvrement de plusieurs phénomènes élémentaires qui se superposent plus ou moins ; l'on distingue généralement 3 régions :

— une région OA, correspondant à une adsorption d'eau par liaison hydrogène, sur des sites fortement polaires ;
— une seconde région A-B linéaire, pouvant être confondue avec la tangente au point d'inflexion des courbes, pour laquelle les molécules d'eau forment une ou plusieurs couches additionnelles plus faiblement retenues. Dans cette région, l'on peut considérer que lorsque l'activité de l'eau croît, la substance dissout de l'eau pour former une solution solide, en suivant la loi de proportionnalité de HENRY ;
— enfin, une troisième région apparaît, lorsque la courbe de sorption s'écarte de la partie linéaire (point B) : une nouvelle phase (aqueuse) apparaît et une quantité d'eau de plus en plus importante se fixe par des forces plus faibles, de nature capillaire ou osmotique.

L'extrapolation de la partie linéaire jusqu'à une activité de l'eau nulle, définit une fraction d'eau très fortement liée à la surface des molécules, par l'intermédiaire de liaisons hydrogène avec les groupements polaires accessibles. Son extrapolation jusqu'à l'activité 1 (point C) représente, en première approximation, la quantité d'eau totale fortement fixée à 100 g de matière sèche. GUILBOT et LINDENBERG (1960) ont montré, dans le cas de la levure de boulangerie, qu'il existe une concordance

satisfaisante entre la quantité d'eau ainsi repérée et celle qui se comporte comme non solvante vis-à-vis des premiers termes des alcools aliphatiques (et de la molécule d'eau elle-même). Cette eau non solvante étant déterminée par mesure de la répartition (à l'équilibre de diffusion) des divers alcools, entre l'eau cellulaire et l'eau du milieu extérieur (LINDENBERG et ZUILIS, 1952).

Bien que pour d'autres systèmes, cette relation ne soit pas toujours vérifiée, il s'est avéré possible, en se basant sur cette observation :

— de déterminer l'activité de l'eau à partir de laquelle apparaît l'eau que nous avons définie comme solvante ;

— de mesurer la valeur de celle-ci par différence, pour une même humidité relative, entre la quantité d'eau fixée par le produit et celle repérée sur la partie linéaire extrapolée.

A partir de cette interprétation permettant de distinguer une eau non solvante, non accessible aux molécules d'eau elles-mêmes, et une eau solvante susceptible d'assurer une plus grande mobilité des composants du milieu, il est possible de mieux caractériser le comportement des activités enzymatiques dans de tels milieux.

Nous considérerons en premier lieu le seuil d'hydratation à partir duquel il est possible de percevoir la manifestation d'une action enzymatique, puis nous examinerons les caractéristiques du développement de cette action au fur et à mesure que l'activité de l'eau s'accroît, ainsi que l'influence de la température sur cette évolution.

SEUIL D'HYDRATATION NÉCESSAIRE AU DÉMARRAGE DE L'ACTION ENZYMATIQUE

ACKER et LUCK (1958) ont montré, que la dégradation de la lécithine d'œuf sous l'action des phospholipases de céréales, ne se produit de façon notable qu'au-delà du point d'inflexion de la courbe de sorption, comme le montre la figure 2.

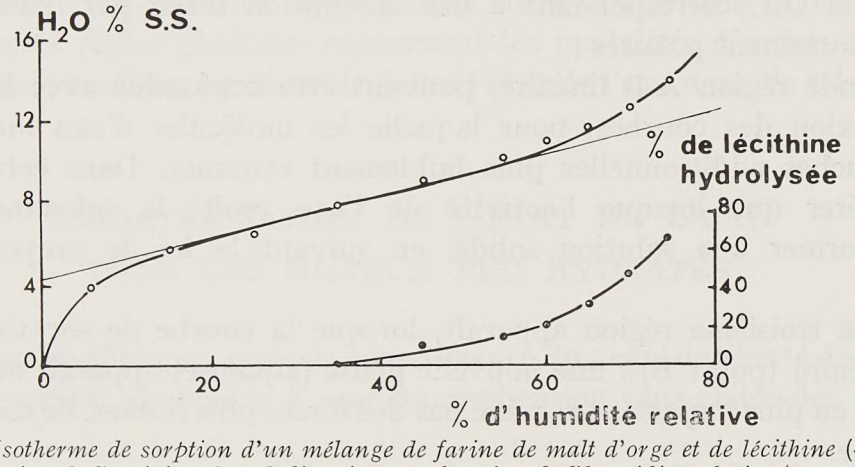


FIG. 2. — *Isotherme de sorption d'un mélange de farine de malt d'orge et de lécithine* (——○——) *et évolution de l'activité phospholipasique en fonction de l'humidité relative* (——●——)

De la même façon, avec GUILBOT (1962), nous avons précisé que la β et l'α amylolyse nécessitent pour se manifester, la présence d'eau solvante. Ceci est illustré sur la figure 3 où nous avons représenté la partie supérieure de la courbe de sorption du mélange et la quantité de maltose formé par la β amylase, en fonction de l'activité de l'eau.

Il convient de faire remarquer à ce sujet que si l'on introduit préalablement dans

le mélange réactionnel amidon-β amylase, une substance très hygroscopique non inhibitrice de l'enzyme, telle que le glycérol, ou encore le chlorure de lithium, on modifie la valeur d'activité de l'eau pour laquelle apparaît l'eau solvante ; consé-

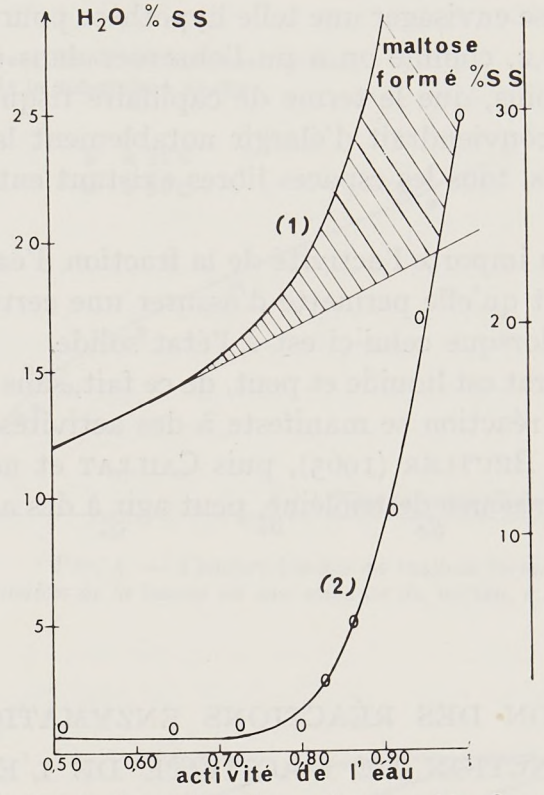


FIG. 3. — *Isotherme de sorption d'un mélange amidon-β amylase* (courbe 1) *et évolution de l'activité β amylasique en fonction de l'activité de l'eau* (courbe 2), *à 31°C*

TABLEAU I

Influence du glycérol et du chlorure de lithium sur le comportement de milieux amidon soluble-bêta amylase, à diverses humidités relatives, à 31°C

Activité de l'eau	0,11	0,20	0,35	0,40	0,52	0,57	0,73	0,85	0,92
Maltose formé, en p. 100 du mélange sec amidon-β amylase :									
1. Milieu sans addition ...	0	0	0	0	0,7	0,7	3	13,4	17,5
2. Milieu avec addition de glycérol		0,6	1,8	11,2	22,2		35,5		
3. Milieu avec addition de chlorure de lithium	2,5								

quemment, le seuil de démarrage de l'action enzymatique se trouve abaissé à une activité de l'eau nettement plus faible que celle déterminée avec un milieu ne contenant pas de glycérol on de chlorure de lithium (tabl. 1).

Divers auteurs ont avancé l'hypothèse qu'il se produit une condensation de l'eau dans les capillaires du produit examiné, permettant le démarrage de l'action enzymatique.

Cependant, si une telle forme d'eau peut exister pour les activités de l'eau élevées, on conçoit mal qu'on puisse envisager une telle hypothèse pour des activités de l'eau aussi faibles que 0,1 ou 0,2, comme on a pu l'observer dans certains cas.

Nous pensons, du moins, que le terme de capillaire risque d'être pris dans un sens trop étroit et qu'il conviendrait d'élargir notablement la notion de capillaire en considérant comme tels, tous les espaces libres existant entre les chaînes macromoléculaires.

De toutes façons, peu importe l'activité de la fraction d'eau possédant le caractère solvant, l'essentiel est qu'elle permette d'assurer une certaine mobilité de l'enzyme et de son substrat lorsque celui-ci est à l'état solide.

Mais, lorsque le substrat est liquide et peut, de ce fait, sans l'aide d'eau solvante, diffuser vers l'enzyme, la réaction se manifeste à des activités de l'eau très faibles. C'est ainsi que Acker et Beutler (1965), puis Caillat et nous-même (1970), ont montré que la lipase, en présence de trioléine, peut agir à des activités de l'eau aussi faibles que 0,025.

ÉVOLUTION DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES EN FONCTION DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU

Pour chaque activité de l'eau supérieure à celle correspondant au seuil de démarrage de l'action enzymatique, la quantité de produit de réaction formé s'accroît et tend vers une limite représentant une valeur d'autant plus importante que l'activité de l'eau est plus élevée. La figure 4 illustre ce phénomène dans le cas de la β amylolyse.

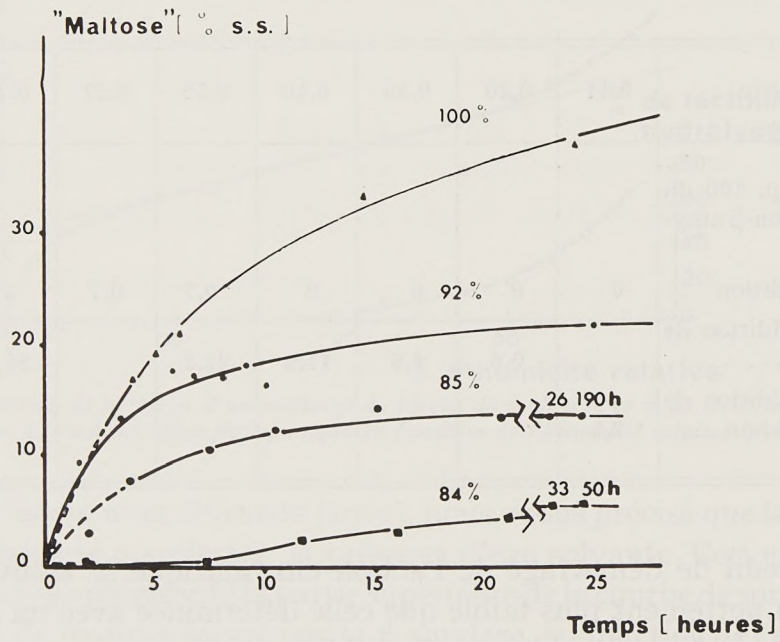


Fig. 4. — *Évolution de la β amylolyse à 31°C, en fonction du temps, à diverses humidités relatives*

Nous avons montré, comme l'indique la fig. 5, qu'il existe, dans le cas de la β amylolyse, une corrélation, apparemment indépendante de la température, de 21 à 31°C, entre la valeur limite de la réaction et la quantité d'eau solvante.

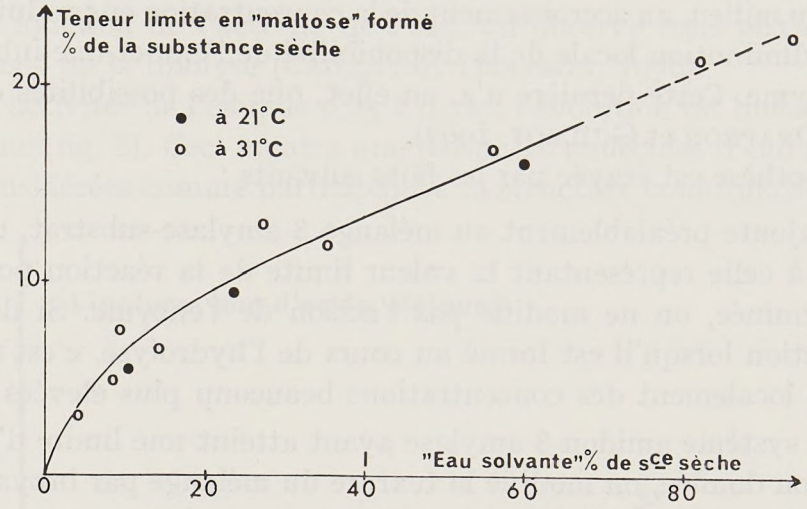


FIG. 5. — *Teneurs limites en maltose formé, en fonction de la teneur en eau solvante du milieu, à 21 et 31°C*

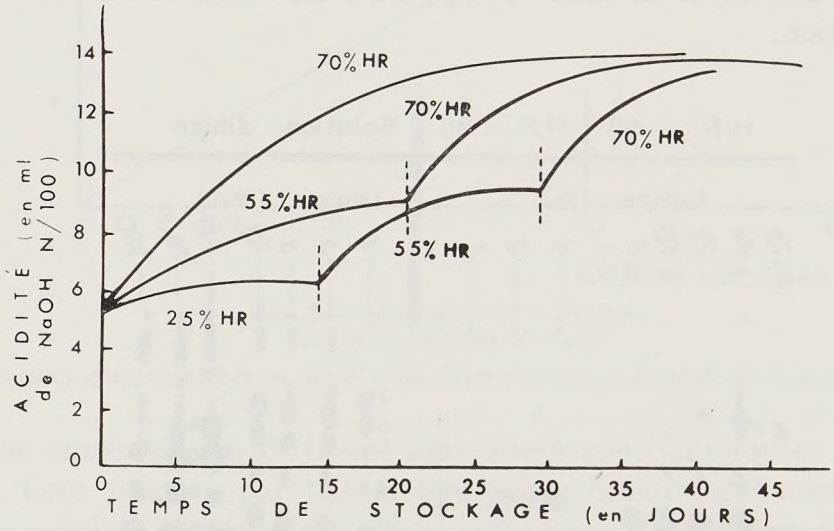


FIG. 6. — *Évolution de l'activité lipolytique, en fonction du temps, de mélanges enzyme-substrat placés successivement à diverses humidités relatives*

On remarque que la teneur limite en maltose s'accroît rapidement pour les 10 premiers pour cent d'eau solvante, l'évolution étant ensuite sensiblement linéaire, au moins jusqu'à une quantité d'eau solvante voisine de 100 p. 100. Tout se passe comme si la quantité d'eau solvante nécessaire pour la libération d'une unité maltose, s'accroissait, parallèlement à la teneur en eau du milieu.

Les travaux de ACKER et de ses collaborateurs ont prouvé que la limite de la réaction n'est pas due à une inhibition irréversible de l'enzyme.

Ainsi, comme l'indique la figure 6, si un système enzyme-substrat (il s'agit ici de lipase et de trioléine) ayant atteint une limite d'hydrolyse à une activité de l'eau donnée est placé à une activité de l'eau supérieure, on aboutit à une nouvelle valeur

limite, égale à celle observée lorsque le système est placé directement à cette dernière activité de l'eau.

Nous avons interprété cette limitation en supposant une réaction topochimique : aux points de contact de l'enzyme avec son substrat il se produit, en raison de la rigidité du milieu, un accroissement de la concentration en produits de la réaction amenant une diminution locale de la disponibilité de l'eau et une inhibition momentanée de l'enzyme. Cette dernière n'a, en effet, que des possibilités de déplacement très limitées (DRAPRON et GUILBOT, 1962).

Cette hypothèse est étayée par les faits suivants :

— lorsqu'on ajoute préalablement au mélange β amylase-substrat, une quantité de maltose égale à celle représentant la valeur limite de la réaction pour une activité de l'eau déterminée, on ne modifie pas l'action de l'enzyme. Si donc, le maltose bloque la réaction lorsqu'il est formé au cours de l'hydrolyse, c'est par le fait qu'il doit atteindre localement des concentrations beaucoup plus élevées ;

— si pour un système amidon-β amylase ayant atteint une limite d'amylolyse pour une hydratation donnée, on modifie la texture du mélange par broyage, ceci permet une nouvelle répartition de l'enzyme par rapport au substrat et provoque ainsi une reprise de l'activité enzymatique ;

— par ailleurs, comme le montrent les chromatogrammes représentés sur la figure 7, le schéma de l'α amylolyse en milieu peu hydraté est sensiblement différent de celui observé en solution.

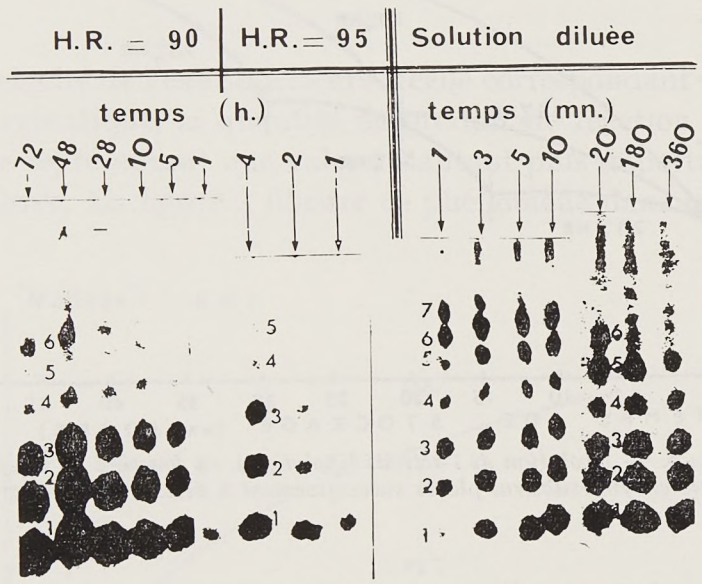


FIG. 7. — *Chromatogrammes de l'α amylolyse* (amylase bactérienne) *à 31°C, en fonction du temps, en milieu solide peu hydraté* (HR : 90 et 95 p. 100) *et en solution diluée*

(1 : glucose, 2 : maltose, 3 : maltotriose,
4 : maltotétraose, 5 : maltopentaose, 6 : maltohexaose, 7 : maltoheptaose)

En milieu peu hydraté, les produits libérés au début de l'hydrolyse sont : du glucose, du maltose et du maltotriose ; alors qu'en solution aqueuse, ce sont surtout des oligosides à chaîne relativement longue qui apparaissent, la quantité de glucose formée au début étant pratiquement négligeable. Cette évolution particulière aux faibles hydratations est considérée comme témoignant d'une attaque enzymatique

localisée dans une zone restreinte des chaînes d'anhydro-glucoses, en raison de la rigidité du milieu.

La lipolyse se présente comme un cas particulier, car la lipase, comme nous l'avons déjà signalé est une des rares enzymes capable de manifester son action sur un substrat liquide sans l'aide d'eau solvante.

En fait, en fonction de l'activité de l'eau, on observe trois phases dans l'évolution de la vitesse de la lipolyse (CAILLAT et DRAPRON, 1970).

Aux faibles activités de l'eau, de 0,25 à 0,025, l'évolution est linéaire et la droite passe par l'origine (fig. 8). Ceci montre que parmi les molécules d'eau les plus fortement fixées, considérées comme participant à la structure conformationnelle active

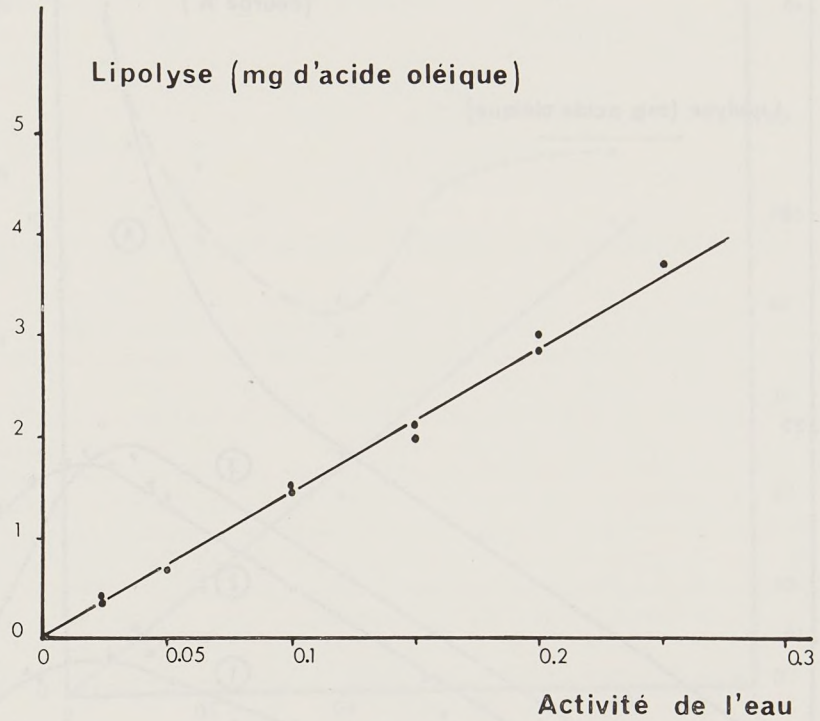


FIG. 8. — *Évolution de la lipolyse aux faibles activités de l'eau*
(acides gras, exprimés en mg d'acide oléique libéré au bout de 72 h, à 30°C),

de la protéine enzymatique, certaines sont directement impliquées dans la réaction d'hydrolyse. Leur fixation par liaison hydrogène constituerait donc l'étape préliminaire de la catalyse enzymatique. Dans cette zone d'activité de l'eau, il apparaît ainsi que le rôle unique de l'eau est celui de substrat.

Au-delà de cette zone, on observe une seconde relation linéaire entre la vitesse d'hydrolyse et l'activité de l'eau, la quantité d'acides gras libérée variant proportionnellement avec la quantité d'eau fixée (fig. 9).

Trois hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène :

— considérée comme substrat, l'eau peut constituer un facteur limitant, une hydratation croissante favorisant la réaction ;

— on peut également penser que cette hydratation conduit à l'augmentation progressive de l'aire interfaciale, l'activité lipolytique étant fonction de ce facteur comme cela a été démontré dans le cas d'une émulsion ;

— enfin, l'eau ainsi fixée peut contribuer à amener l'enzyme sous un état conformationnel de plus en plus réactif.

On se rend compte sur la figure 9 qu'aux activités de l'eau élevées, la valeur limite de la réaction ne continue pas à croître, mais passe par un maximum. Contrairement à ce que l'on observe dans le cas de l'amylolyse dans la zone correspondant à l'eau solvante, une certaine inactivation de la lipase se manifeste et l'on constate que l'activité enzymatique est d'autant plus faible que la température est plus élevée. Il se produit là, vraisemblablement, une inactivation hydrothermique à laquelle la lipase est particulièrement sensible.

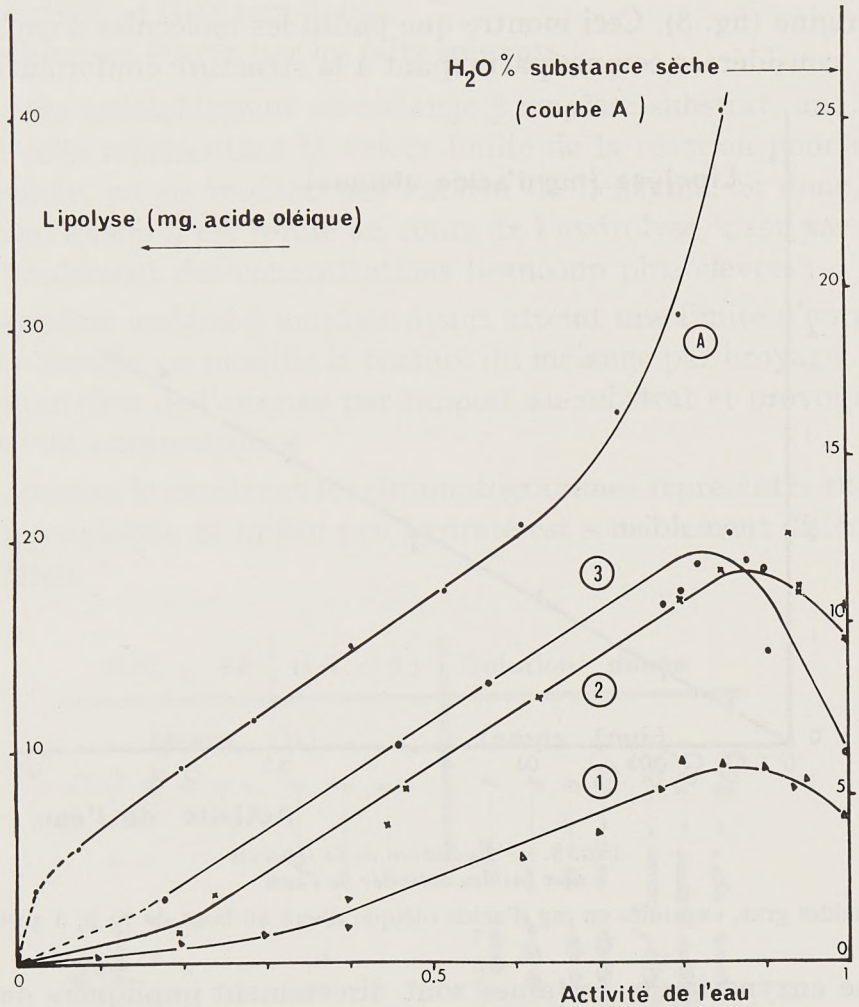


FIG. 9. — *Évolution de la lipolyse en fonction de l'activité de l'eau, à 20°C* (courbe 1), *30°C* (courbe 2) *et 40°C* (courbe 3)

L'isotherme de sorption du mélange (son de blé + huile d'olive) est représenté par la courbe A ; il ne varie sensiblement pas entre 20 et 40°C

De même, alors qu'on constate qu'entre 20 et 30°C aux activités de l'eau plus faibles, le Q_{10} de la réaction est voisin de 2, comme pour les autres enzymes ; par contre, l'accroissement d'activité est faible entre 30 et 40°C. Ces températures étant situées de part et d'autre de l'optimum, un début d'inactivation de l'enzyme a pu se produire.

En suivant l'évolution de la lipolyse à 30°C, aux activités de l'eau inférieures à 0,8, en fonction de la quantité de substrat mise en jeu, nous avons pu obtenir les valeurs des paramètres cinétiques Vm et Km (CAILLAT et DRAPRON, 1970). Les variations observées sont représentées sur la figure 10.

On constate que Vm est linéaire et que la droite passe par l'origine. Ceci ne fait

que refléter, à notre avis, le rôle de l'eau dans la désacylation du complexe enzyme-substrat, des quantités d'eau croissantes permettant à la réaction d'atteindre des taux d'hydrolyse croissants.

La courbe traduisant la variation de Km passe par un minimum pour une activité de l'eau comprise entre 0,3 et 0,4, l'affinité de l'enzyme pour son substrat étant maximum.

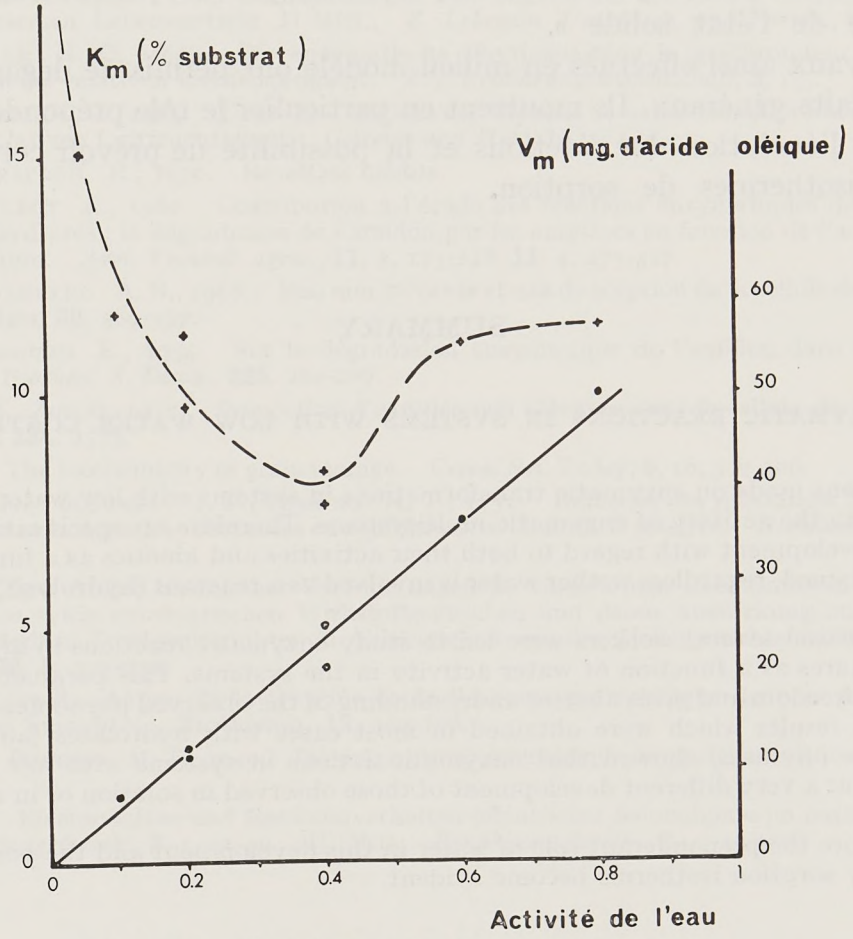


FIG. 10. — *Évolution, en fonction de l'activité de l'eau, à 30°C, des paramètres cinétiques V_m et K_m de la réaction enzymatique*

V_m est exprimé en mg d'acide gras libérés au bout de 72 h et K_m en quantité de substrat, p. 100 de la préparation enzymatique V_m : ——o——, K_m — — — + — — —

On peut alors faire l'hypothèse, qu'aux activités de l'eau inférieures, l'hydratation de la protéine enzymatique est insuffisante pour lui assurer une conformation réactionnelle optimum. Aux activités de l'eau supérieures, l'excès d'eau gênerait la formation du complexe enzyme-substrat, du fait de l'hydrophobicité de ce dernier. Au-delà d'une activité de l'eau voisine de 0,6, avec l'apparition d'eau solvante, la valeur de Km demeure constante et voisine de celle observée en milieu aqueux dilué.

CONCLUSION

Il apparaît donc que si les lois classiques de la cinétique enzymatique semblent toujours s'appliquer, il faut toutefois tenir compte de l'influence du facteur activité de l'eau.

Alors que les milieux aqueux dilués comportent des facteurs d'environnement faibles et d'un niveau sensiblement constant, en milieu peu hydraté ces facteurs prennent des valeurs totalement différentes et varient de façon importante en fonction de la présence d'eau solvante ou de réactant liquide. La diffusion des molécules, leurs rotations propres, les rencontres enzyme-substrat, la formation des complexes réactionnels et la séparation des produits de la réaction en sont par conséquent fortement affectés. Ainsi que ACKER l'a déjà souligné ceci justifie bien une « chimie enzymatique de l'état solide ».

Les travaux ainsi effectués en milieu modèle ont permis de dégager un certain nombre de faits généraux. Ils montrent en particulier le rôle prépondérant de l'état de l'eau sur l'évolution des réactions et la possibilité de prévoir cette évolution à partir des isothermes de sorption.

SUMMARY

ENZYMATIC REACTIONS IN SYSTEMS WITH LOW WATER CONTENTS

Observations made on enzymatic transformations in systems with low water contents relate in some cases to the activity of enzymatic multisystems. Therefore no specifications concerning the enzyme development with regard to both their activities and kinetics as a function of hydration can be obtained, regardless wether water is involved as a reactant (hydrolysis) or in any other way.

For this reason several workers were led to study enzymatic reactions in artificial enzyme-substrate mixtures as a function of water activity in the systems. This parameter indicates the degree of watr freedom and gives abetter understanding of the observed phenomena.

Thus, the results which were obtained in most cases with hydrolases (amylases, lipases, phospholipases, phytases) showed that enzymatic actions in systems with low water contents generally exhibit a very different development of those observed in solution or in aqueous dispersion.

Furthermore the preponderant role of water in this development and the possibility of foreseeing them by sorption isotherms become evident.

ZUSAMMENFASSUNG

ENZYMATISCHE REAKTIONEN IN WASSERARMEN MILIEU

Bisherige Beobachtungen über enzymatische Veränderungen in natürlichem, wasserarmen Milieu beziehen sich in gewissen Fällen auf die Aktivität von komplexen Enzymsystemen. Es ist kaum möglich, daraus Folgerungen auf die Entwicklung der Enzymwirkung in bezug auf ihre Aktivität und ihre Kinetik unter Berücksichtigung der Hydratation zu schliessen, ganz gleich ob Wasser dabei als Reaktant (Hydrolyse) oder in einer anderen Form eine Rolle spielt. Mehrere Forscher machten daher Modellversuche, um enzymatische Wirkungen in künstlichen Enzym-Substrat Systemen in Abhängigkeit der Wasseraktivität des Milieus zu untersuchen. Durch diesen Parameter wird der Freiheitsgrad des Wassers im System erkannt, und die beobachteten Reaktionen werden genauer verstanden. Die auf diese Weise, meistens mit Hydrolasen (Amylasen, Lipasen, Phospholipasen, Phytasen) erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass enzymatische Wirkungen in wasserarmem Milieu, verglichen mit denen in wässriger Lösung oder in Dispersion, allgemein eine sehr unterschiedliche Entwicklung zeigen. Weiterhin wurde die vorherrschende Rolle des Wasserzustandes auf die Entwicklung der beobachteten Phenomäne hervorgehoben, und die Möglichkeiten, diese Reaktion aus den Sorption-Isothermen vorauszubestimmen, aufgezeigt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACKER L., LUCK E., 1958. Über den Einfluss der Feuchtigkeit auf den Abbau enzymatischer Reaktionen in wasserarmen Lebensmitteln. I. Mitt., *Z. Lebensm. Untersuch. und Forsch.*, **108**, 3, 256-269.

ACKER L., KAISER H., 1959. Über den Einfluss der Feuchtigkeit auf den Ablauf enzymatischer Reaktionen in wasserarmen Lebensmitteln. II Mitt., *Z. Lebensm. Untersuch. und Forsch.*, **110**, 5, 349-356.

ACKER L., BEUTLER H. O., 1963. Die enzymatische Phytinspaltung in geschrotetem Getreide und Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit. *Z. f. Ernährungswissenschaft*, **3**, 1-5.

ACKER L., BEUTLER H. O., 1965. Über die Tätigkeit der Lipasen in Getreidemahlprodukten in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit. *Getreide und Mehl*, **15**, 1, 4-6.

CAILLAT J. M., DRAPRON R., 1970. Résultats inédits.

DRAPRON R., GUILBOT A., 1962. Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés : la dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 3, 175-218, **11**, 4, 275-317.

GUILBOT A., LINDENBERG A. B., 1960. Eau non solvante et eau de sorption de la cellule de levure. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 389-397.

KIERMEIER F., CODURO E., 1954. Sur la dégradation enzymatique de l'amidon dans les substances séchées à l'air. *Biochen. Z. Dtsch.*, **325**, 280-287.

LINDENBERG A. B., ZUILIS, 1952. Proportion d'eau liée non solvante dans la cellule de levure. *C. R. Acad. Sci.* Paris, **134**, 2573.

LINKO P., 1960. The biochemistry of grain storage. *Cereal Sci. Today*, **5**, 10, 302-306.

MASHKOVCEV M. F., VOLGUNOV G. P., POKHNO M. T., 1951. Influence des substances hygroscopiques accompagnant les enzymes, sur les substances en équilibre avec l'humidité relative. *Biokhimija S. S. S. R.*, **16**, 1, 24-28.

PURR A., 1970. Zum Ablauf chemischer Veränderungen in wasserarmen Lebensmitteln II : Versuche mit Lipoxygenase sowie enzymatischen Wirkstoffgemischen und deren Auswirkung auf den autoxydativen Fettverderb in Trockenprodukten in Abhängigkeit von der Gleichgewichtsfeuchtigkeit. *Fette. Anstrichmittel.*, **72**, 8, 725-732.

VOLGUNOV G. P., 1948. Action de la trypsine et de l'enzyme protéolytique du pois sur un substrat amené à diverses humidités. *Biokhimija*, **13**, 104-108.

VOLGUNOV G. P., POKHNO M. T., 1949. Décomposition enzymatique de protéines séchées à l'air. *Biokhimija*, **14**, 305.

ROTHE M., 1958. Eigenschaften und Reaktionverhalten pflanzlicher Samenlipase im natürlichen Milieu. I. Mitt. *Ernährungsforsch.*, **3**, 1, 21-40. II. Mitt. *Ernahrungsforsch.*, **3**, 1, 41-51.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 501-513.

ENZYMATISCHE VERÄNDERUNGEN IN DER TIEFKÜHLKOST

A. FRICKER

Institut für Chemie und Technologie
der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, 75 - Karlsruhe-1 (R. F. A.)

ZUSAMMENFASSUNG

Das Tiefgefrieren ist eines der wichtigsten und auch schonendsten Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln. Diese enthalten aber stets Enzyme, welche verschiedenartige Veränderungen des Lebensmittels bei seiner Lagerung bewirken können. Der Gefrierprozess als solcher beeinflusst die Enzyme je nach Art in wechselndem, meist geringem, Umfang, so dass im gefrorenen Produkt die Enzyme zumindest zum Teil noch unverändert vorliegen. Durch die Temperaturabsenkung wird aber auch die Geschwindigkeit der enzymatisch bedingten Reaktionen stark vermindert, wobei der Grad der Verlangsamung von der Art des jeweiligen Enzyms abhängt. Für die praktische Haltbarkeit tiefgefrorener Lebensmittel stehen dabei folgende Enzymgruppen im Vordergrund des Interesses : Proteinasen, Lipasen und Lipoxigenasen, da diese ubiquitär vorhanden sind und die durch sie katalysierten Reaktionen den Verderb von Lebensmitteln wesentlich beeinflussen. Es hat sich nun gezeigt, dass die Proteinasen unterhalb der für die Gefrierlagerung üblichen Temperatur von — 18° praktisch keine Wirksamkeit mehr entfalten, während Lipasen und Lipoxydasen speziell im Hinblick auf das Substrat Phospholipide im Einzelfalle auch bei tiefen Temperaturen, wenn auch sehr langsam, noch wirksam sein können. Beispiele aus der neueren Literatur für solche Befunde (Freisetzung von Fettsäuren bei längerer Gefrierlagerung, Entstehung von Oxydationsprodukten, etc.) werden angeführt ; ihre Bedeutung für die Haltbarkeit tiefgefrorener Lebensmittel wird diskutiert.

EINLEITUNG

Das Gefrieren von Lebensmitteln und deren Lagerung bei Temperaturen unter — 18° ist eine Form der Haltbarmachung, die sehr viele Vorteile in sich birgt. Gelingt es doch damit, bei sehr vielen Produkten den Zustand der « Frische » über einen erheblichen Zeitraum zu bewahren, d.h. ein Lebensmittel so aufbewahren zu können, dass es auch nach längerer Zeit in einem Zustand der Verwertung, sei es

im Sinne einer Weiterverarbeitung, sei es im Sinne einer direkten Verwendung im Haushalt, zugefürt werden kann, der weitgehend dem frischen Zustand entspricht. Es wäre aber falsch, anzunehmen, man müsse ein Lebensmittel nur gefrieren, um eine *unbegrenzte* Haltbarkeit zu erreichen. Durch das Gefrieren werden zwar alle chemischen Vorgänge sehr stark verlangsamt — man darf nur an das van t'Hoff'sche-Gesetz, nach dem die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Veränderung der Reaktions temperatur um 10° etwa um den Faktor 2 bis 3 ansteigt bzw. abfällterinnern, um zu sehen, dass auch im tiefgefrorenen Produkt noch Reaktionen möglich sind. Direkte mikrobiologische Einwirkungen sind allerdings weitgehend ausgeschlossen, da Mikroorganismen unter — 10 bis — 15°C ihre Tätigkeit völlig einstellen ; bei Temperaturen von — 8° und höher müsste man an sich solche Fragen auch noch berücksichtigen, da bis zu diesen Temperaturen noch die Vermehrung einzelner Mikroorganismentypen möglich ist ; mit der Vermehrung ist aber auch die Freisetzung von Enzymen verbunden.

Damit wären wir bei dem Stichwort unseres Themas angelangt : den Enzymen. Befasst man sich mit den Enzymen in tiefgefrorenen Produkten, so muss man prinzipiell zwei Punkte unterscheiden :

1. Werden durch den Vorgang des Gefrierens an sich die Enzyme geschädigt und in welchem Umfange?
2. Entwickeln im tiefgefrorenen Produkt bei den Gefrierlagerungstemperaturen die noch vorhandenen Enzyme eine Aktivität?

Die Schädigung von Enzymen durch den Gefrierprozess ist vielfach bearbeitet worden, wobei die verschiedensten Enzymarten überprüft wurden. Ich möchte hier nur auf eine Arbeit von *Pallavicini* (1) hinweisen, der aus gefrorenen Erdbeeren nach bestimmten Lagerungszeiten bei — 20° Phenolase, Phosphatase, Peroxydase, Katalase, Amylase und Proteinasen isolierte und deren Aktivität in Abhängigkeit von der Lagerungszeit bestimmte. Ähnliche Arbeiten sind insbesondere aus dem Bereich der physiologischen Chemie von Tier und Mensch bekannt geworden.

Ich glaube aber, dass das Thema meines Referates sich ausschliesslich auf den zweiten der o.g. Punkte bezieht, auf die Frage also, inwieweit die in Lebensmitteln vorkommenden Enzyme *während* der Gefrierlagerung von Lebensmitteln noch eine Aktivität entwickeln. Diesen Problemen ist früher sehr aus führlich nachgegangen worden ; ich darf nur an zusammenfassende Literaturberichte von Kiermeier (2) und von Joslyn (3) erinnern.

Welche Enzymarten sind nun in diesem Zusammenhange von Bedeutung? Ich glaube, man muss hier insbesondere auf die Gruppe der lipidverändernden Enzyme hinweisen, sowie auf die proteolytischen Enzyme, denn diese sind wohl die wichtigsten für die Qualitätsminderungen tiefgefrorener Produkte während der Lagerung bzw. für deren letztendlich eintretenden Verderb. Man weiss auch, dass diese beiden Enzymgruppen durch den Gefrierprozess an sich relativ wenig geschädigt werden, ja es besteht durchaus die Möglichkeit, dass überhaupt keine Schädigung eintritt. Andererseits ist es von Enzym zu Enzym durchaus verschieden, ob es bei— 18° und tiefer noch eine Aktivität entfaltet, oder nicht.

Von den genannten wichtigen Enzymgruppen sind nun für den Lebensmitteltechnologen erfreulicherweise die Proteinasen unter — 18° nicht mehr aktiv, zumindest nur noch in einem Umfange, der praktisch ohne Bedeutung ist.

Praktisch wichtig sind aber die fettspaltenden Enzyme, die ich demzufolge in den Mittelpunkt der Erörterungen stellen möchte.

Bei der Vielzahl der Lebensmittel, die durch Gefrierlagerung haltbar gemacht werden, muss ich mich hinsichtlich der Produkte auch einer Beschränkung unterwerfen, und zwar möchte ich nur drei Gruppen beispielhaft hervorheben : Fisch, Hühnerfleisch und Gemüse. Es handelt sich dabei um die Lebensmittel, die, wenn wir vom Fleisch absehen, in grösstem Umfange tiefgefroren werden ; so beträgt z.B. der Anteil des tiefgefrorenen Geflügels an der gesamten Produktion von Tiefkühlkost in Deutschland etwa 50 p. 100. Die Vermarktung eines Fisches guter Qualität ist praktisch nur noch über den seegefrosteten Fisch möglich ; Spinat und Erbsen stellen ebenfalls einen erheblichen Anteil an den gefrorenen Lebensmitteln.

VERÄNDERUNGEN DER LIPIDFRAKTION VON HÜHNERMUSKELN

Als Beispiel für die bei der Gefrierlagerung von Hühnern bzw. Hühnermuskeln eintretenden Veränderungen der Lipidfraktion, die mit Sicherheit zum allergrössten Teil auf enzymatischen Vorgängen beruhen, möchte ich eine Arbeit von DAVIDKOVA und KHAN (4) zitieren. Die genannten Autoren lagerten Hähnchen bei — 10°C für zwei Jahre ; zum Vergleich wurden Hähnchen aus der selben Schlachtung bei — 80°C gelagert, da bei dieser sehr tiefen Temperatur in diesem Zeitraum keine enzymatischen Reaktionen zu erwarten waren. Sie bestimmten in den Lipiden der Hühnermuskeln, die zu etwa 1,1 p. 100 enthalten waren und zu etwa 60 p. 100 aus Phospholipiden und etwa 30 p. 100 aus Triglyceriden bestanden, die Veränderungen im Gehalt an Phospholipiden, an freien Fettsäuren und an Triglyceriden. Das Ergebnis gibt tabelle 1 wieder.

TABELLE 1

Abbau der Phospholipide in Hühnermuskel

(Angaben in mg/100 g Frischgewicht bzw. P. 100 der Ausgangsmenge)

	Lag. Temp.		% Abbau
	— 80°C	— 10°C	
Phosphatidylcholin	308	168	— 140
Phosphatidyläthanolamin	173	50	— 123
Phosphatidylserin	63	20	— 43
Sphingomyelin	33	33	± 0
Lysophosphatidylcholin	0,4	1,2	+ 200
Freie Fettsäuren	100	390	+ 290

Man sieht, dass in dem Zeitraum von zwei Jahren eine Abnahme des Phospholipidgehaltes um fast die Hälfte eintrat und eine Erhöhung der freien Fettsäuren auf fast das vierfache zu beobachten war. Gleichzeitig fand sich eine Erhöhung des

Triglyceridgehaltes und eine Erhöhung des Lysolecithingehaltes ; die Abnahme der Phospholipide bezog sich insbesondere auf die Lecithine und auf die Sphingomyeline. Man sieht, dass bei dieser allerdings relativ hohen Lagerungstemperatur doch ganz erheblich Veränderungen im Lipidanteil eingetreten sind, insbesondere im Sinne einer Freisetzung von Fettsäuren, also einer Lipolyse. Die Zunahme des Triglyceridanteiles wird von den Autoren damit erklärt, dass im Verlaufe der Lagerung eine Spaltung von Triglycerid-Protein-Komplexen eintrit. Diese ursprünglich vorhan denen relativ festen Komplexe werden mit Chloroform-Methanol nicht quantitativ eluiert und die Autoren nahmen an, dass bei der Gefrierlagerung die Bindung Lipid-Protein im Komplex gelockert würde, so dass eine Erfassung durch die Extraktion möglich ist. Man könnte aber auch daran denken, dass eine echte enzymatische Transacylierung eingetreten ist, denn neuere Untersuchungen an unserem Institut haben ergeben, dass z.B. in gefriergetrockneten Produkten solche Transacylierungen, die mit Sicherheit durch Enzyme gesteuert sind, auftreten können ; wir konnten z.B. die Neubildung von Sterinestern während der Lagerung von gefriergetrockneten Produkten beobachten. DAVIDKOVA und Mitarbeiter haben bei ihren Untersuchungen auch zeigen können, dass die Zunahme der freien Fettsäuren zu etwa 70 p. 100 der Wirkung einer Phospholipase B zuzuschreiben ist. Nur 30 p. 100 der freigesetzten Fettsäuren entstammten den Triglyceriden, deren Menge aber aus den erwähnten beiden Gründen insgesamt zunimmt. Über Einzelheiten informiert das nächste Bild, das einen Auszug aus einer von den beiden Autoren gebrachten Tabelle darstellt.

TABELLE 2

Wirkung der Lagertemperatur auf den Gehalt
von Hühnermuskel an Phospholipiden, FFS und Triglyceriden
(in mg/100 g Feuchtgewicht)

Lipid-Fraktion	— 80°C	— 10°C	
Phospholipide (als P berechnet) ...	27	15	Lager-
FFS (als Ölsäure berechnet).....	100	390	zeit
Triglyceride (als Triolein berechnet)	685	760	2 Jahre

Nach E. DAVIDKOVA und A. W. KHAN, (1967) *J. of Food Sc.* 32, 35.

Man könnte nun sagen, dass solche Fettveränderungen, insbesondere die Freisetzung von Fettsäuren, bei den dafür in Frage kommenden geringen Mengen für den Qualitätszustand des Produktes nicht sehr bedeutsam wären, denn höhere Fettsäuren sind ja geruch- und geschmacklos. Nun, dazu ist zu sagen, dass einerseits natürlich noch ein weiterer Abbau eintreten kann unter Bildung von geruchs- und geschmacksaktiven Stoffen, und zum anderen diese Lipidveränderungen sich auf die Proteine auswirken können. Es konnte nämlich in einer früheren Arbeit der erwähnten Autoren gezeigt werden, dass die vorherrschenden Proteinveränderungen

im gefrorenen Hühnermuskel eine Verminderung der Löslichkeit von Actomyosin und eine Ansammlung von Protein-Abbau-produkten sind. Es besteht nun eine Beziehung zwischen Phospholipidabbau, Bildung von freien Fettsäuren und Proteindenaturierung, was z.B. von DYER (5) bei gefrorenem Fisch gezeigt wurde ; zu ähnlichen Befunden kamen EL-GHARHAWI und DUGAN (6). Der Annahme, dass im Hühnermuskel ähnlich Verhältnisse vorliegen, stehen keine schwerwiegenden Bedenken gegenüber. Vielmehr konnten KING und Mitarbeiter (Zitiert nach DYER (5)) feststellen, dass kleine Mengen an freier Linol- und Linolensäure die Löslichkeit von Actomyosin aus Kabeljau verringern. Eine Abhängigkeit von Proteindenaturierung und Lipidhydrolyse dürfte demnach gegeben sein ; die Proteindenaturierung spielt aber für die Qualität des Hühnerfleisches eine merkliche Rolle.

VERÄNDERUNGEN DER LIPIDFRAKTION VON TIEFGEFRORENEN FISCHEN

Auch bei tiefgefrorenen Fischen ist die Freizetzung von Fettsäuren durch Enzyme ein relativ leicht zu erfassender Vorgang. So berichtet LOVERN (7), dass nach dem Ablaufen der sogenannten « Lag-Phase » eine Zunahme der freien Fettsäuren in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur eintritt. Tabelle 3, gibt die von LOVERN gebrachten Zahlen wieder, wobei auch Temperaturen über 0° zum Vergleich herangezogen werden.

TABELLE 3

Abhängigkeit der Zunahme der freien Fettsäuren in Fisch von der Lagerungstemperatur

Temp. °C	Zunahme p. 100	Tage
+ 20	15	4,5
± 0	15	9
— 7	15	5
— 14	15	
— 22	15	250
— 29	15	1 000

Nach J. A. LOVERN, (1962). *Rec. Adv. Food Sci.*, Vol. 1, S. 194, 199

Wir sehen, dass eine Zunahme um 15 p. 100 des Ausgangsgehaltes an freien Fettsäuren bei — 29°C erst nach etwa 1 000 Tagen eingetreten ist, während bei — 22°C nur 250 Tage bis zu diesem Punkt verstreichen. Ich möchte aber auch noch darauf hinweisen, obwohl es nicht direkt zum Thema gehört, dass bei — 7° die

Fettsäurefreisetzung praktisch genau so schnell vor sich geht, wie bei + 20°C. Ein Befund, der sich auch in anderem Zusammenhang immer wieder reproduzieren lässt und der ein Hinweis dafür ist, dass die Temperaturen zwischen 0 und — 8° relativ « gefährlich » im Hinblick auf die Lagerungsstabilität von Lebensmitteln sind. Die Geschwindigkeit der Fettspaltung ist in einem bestimmten Bereich unter 0° eher grösser als über 0°. Die Lipaseaktivität, auf der ja diese Freisetzung von Fettsäuren beruht, ist aber, wie auch LOVERN betont, sehr stark von der Fischart abhängig. So fand er bei 11 Teleostiern nach 21 Wochen Lagerung bei — 14° einen Phospholipidverlust von 150 bis 380 mg je 100 g Gewebe und eine Produktion von 140 bis 280 mg freien Fettsäuren je 100 Gewebe. Unter den gleichen Bedingungen war aber bei 4 Arten von Elasmobranchiern der Phospholipidabbau vernachlässigbar klein, obwohl die beiden Arten etwa gleichviel Phospholipide enthielten. Demnach scheint bei den Knochenfischen eine Phospholipase während der Gefrierlagerung aktiv zu sein, während bei den Knorpelfischen diese Aktivität kaum vorliegt.

Ich darf hier nochmals auf die Zusammenhänge zwischen der Freisetzung von Fettsäuren im tiefgefrorenen Fisch mit der Proteindenaturierung eingehen. ACKMANN (8) gelangte aufgrund seiner Versuche zu der Ansicht, wie sie auch von OLLEY usw., wie bereits erwähnt, vertreten wird, dass die freigesetzten Fettsäuren die Proteindenaturierung fördern und eng mit ihr verbunden sind, und bestätigte dies in Modellversuchen mit Actomyosin aus Kabeljau ; aber auch hier scheinen wieder von Tierspezies zu Tierspezies Unterschiede vorzuliegen, denn ANDERSON und STEINBERG (9) beobachteten, dass bei Makrelen und beim Haifisch die Verhältnisse etwas anders liegen und zwar verminderten bei ihren Versuchen die Lipide die Proteindenaturierung. Eine Deutung für diesen Befund wird von HANSON und OLLEY (10) gegeben : Danach soll das Eiweiss durch die neutralen Lipide in den Zellen gegen freie Fettsäuren geschützt werden, da diese Spezies relativ viel Fett enthalten und zwar in Form von Neutralfetten, die ein gutes Lösungsvermögen für freie Fettsäuren aufweisen, denen dadurch die Reaktion mit den Proteinen erschwert wird. Dieser Ansicht treten auch HAMOSCH, ATIA und SHAPIRO (11) bei, die fanden, dass die Spaltung der Phosphatide nur bis zu einem Grenzwert geht. Ähnliches beobachteten BLIGH und SCOTT (12), die bei — 12° eine ziemlich rasche Spaltung des Phosphatidyläthanolamins fanden, die aber nach 4 Monaten aufhörte, obwohl noch 1/3 der ursprünglichen Menge an diesem Phosphatid unhydrolisiert vorlag. Das gleiche gilt für Phosphatidylcholin ; interessant erscheint auch, dass eine Anhäufung von Lysolecithin nicht gefunden werden konnte.

Dass nicht nur Lipasen, sondern auch Lipoxydasen in tiefgefrorenem Fisch noch wirksam sein können, möchte ich mit einer Arbeit von LAUDER (13) und Mitarbeitern belegen. Diese ermittelten die Thiobarbitursäurezahlen von nach verschiedener Vorlagerung auf Eis tiefgefrorenen Fischen, um damit den Einfluss des Gefrierzeitpunktes, je nachdem, ob dieser vor oder nach dem *Rigor mortis* lag, zu studieren. Ich möchte auf diese Fragen garnicht eingehen, sondern nur an Hand der nächsten beiden Bilder zeigen, dass auch im tiefgefrorenen Zustand ein kontinuierlicher Anstieg der Thiobarbitursäurezahlen eintritt, wobei mit grosser Wahrscheinlichkeit ein Teil dieser Oxydationsvorgänge enzymatischer Natur sein dürfte. Es ist allerdings nicht abzuschätzen, wie gross der Anteil von Autoxydation bzw. enzymatischer Oxydation ist ; die beiden Abbildungen sollen nur demonstrieren, dass solche oxydativen Vorgänge ablaufen,

Diese wenigen Beispiele aus dem Bereich « Fisch » mögen genügen. Ich möchte mich ein wenig ausführlicher noch dem letzten Produkt zuwenden, das ich eingangs genannt hatte, nämlich dem Gemüse.

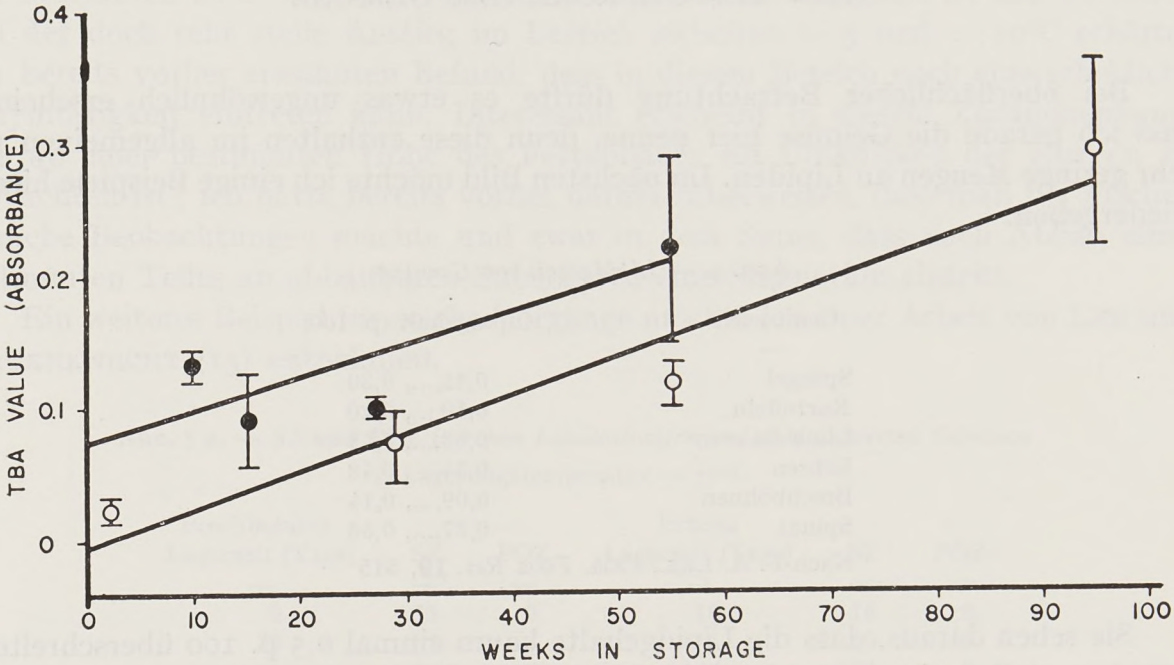


Abb. 1.— TBA- *values in frozen red fish ; stor. temp. — 23°C*
○ = processed after 2 days in ice
● = processed after 4 days in ice
Nach J.T. Lauder and W.A. Mc Callum, *J. Fish. Res. Board Can.* **27**, 1589 (1970).

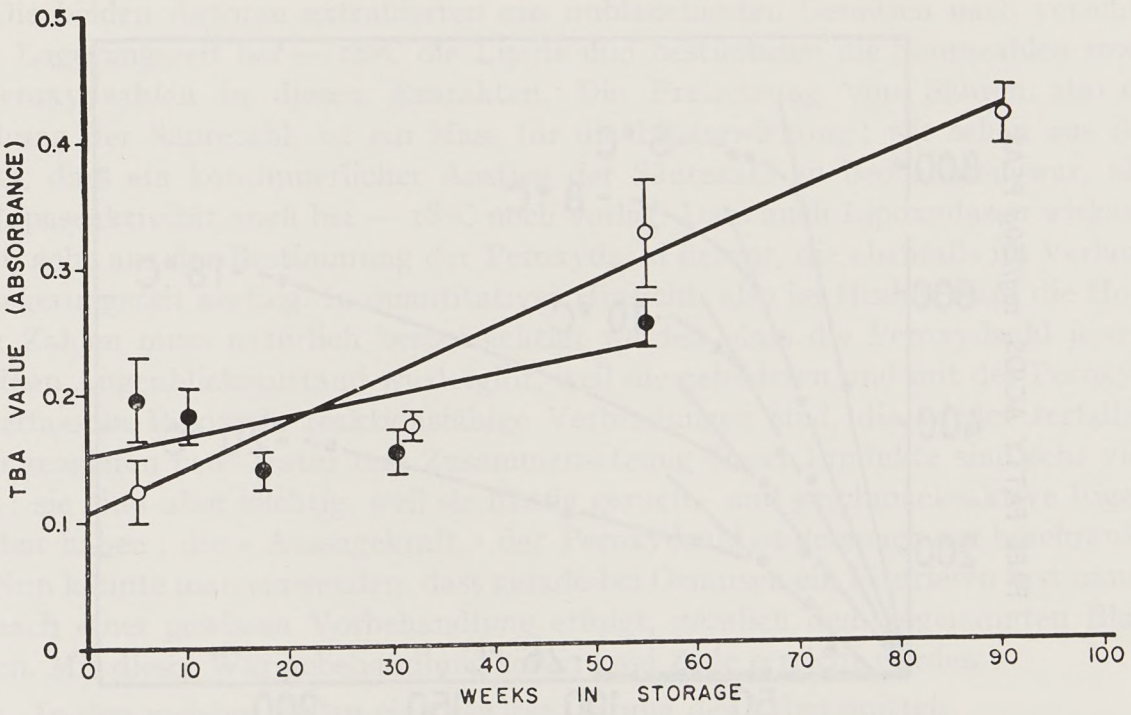


Abb. 2.— TBA- *value in frozen red fish ; stor. temp. — 23°C*
○ = processed after 2 days in ice
● = processed after 10-12 days in ice
Nach J.T. Lauder and W.A. Mc Callum, *J. Fish. Res. Board Can.* **27**, 1589 (1970).

VERÄNDERUNGEN DER LIPIDFRAKTION VON TIEFGEFRORENEM GEMÜSE

Bei oberflächlicher Betrachtung dürfte es etwas ungewöhnlich erscheinen, dass ich gerade die Gemüse hier nenne, denn diese enthalten im allgemeinen nur sehr geringe Mengen an Lipiden. Im nächsten Bild möchte ich einige Beispiele hierfür wiedergeben.

Abb. 3. — *Lipidgehalt von Gemüsen*

Gemüseart	Lipidgehalt (p. 100)
Spargel	0,15,..., 0,30
Kartoffeln	0,10,..., 0,20
Lima-Bohnen	0,33,..., 0,49
Erbsen	0,34,..., 0,48
Brechbohnen	0,09,..., 0,14
Spinat	0,27,..., 0,58

Nach F. A. Lee., 1954. *Food Res.* **19**, 515

Sie sehen daraus, dass die Lipidgehalte kaum einmal 0,5 p. 100 überschreiten ; trotzdem stellen sie einen wichtigen Faktor für die Qualitätserhaltung von tiefgefrorenem Gemüse dar, da, wie bereits demonstriert, die lipidspaltenden Enzyme bei der Gefrierlagertemperatur noch aktiv sein können. Auch dabei ist eine klare Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur festzustellen, was ich mit einem Bild aus einer Arbeit von Bengtson und Bosund (14) demonstrieren möchte.

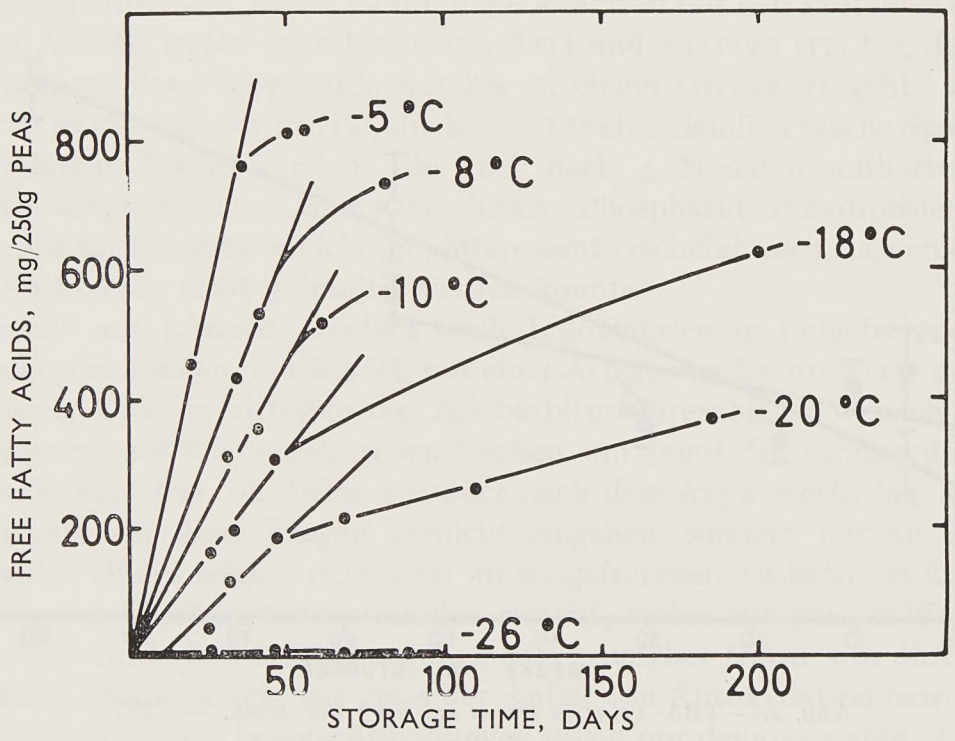


Abb. 4

Die Autoren froren rohe Erbsen ein und lagerten sie bei den verschiedenen Temperaturen, extrahierten nach bestimmten Zeiten die Fettsäuren undermittelten deren Menge. Man sieht, dass bei — 18 bzw. — 20° noch eine deutliche Freisetzung von Fettsäuren erfolgte, während bei — 26° innerhalb von 100 Tagen keine Bildung von Fettsäuren zu beobachten war. Die Temperaturabhängigkeit ist klar zu sehen und der doch sehr steile Anstieg im Bereich zwischen — 5 und — 10°C erhärtet den bereits vorher erwähnten Befund, dass in diesem Bereich noch eine erhebliche Enzymtätigkeit eintreten kann. Interessant erscheint in diesem Zuzammenhang, dass ab einer bestimmten Höhe des Fettabbaues ein Umknicken der Kurven zu beobachten ist ; ich hatte bereits vorher darauf hingeweisen, dass man bei Fischen ähnliche Beobachtungen machte und zwar in dem Sinne, dass nach Abbau eines bestimmten Teiles an abbaubaren Substanzen eine Stagnation eintritt.

Ein weiteres Beispiel für solche Vorgänge möchte ich einer Arbeit von LEE und WAGENKNECHT (15) entnehmen.

ABB. 5 *a*. — *SZ und POZ in rohen Lipidextrakten aus unblanchierten Gemüsen*

Lagerungstemperatur — 18°C

Brechbohnen Lagerzeit (Tage)	SZ	POZ	Erbens Lagerzeit (Tage)	SZ	POZ
—	—	—	—	—	—
0	11	0	16	16	0
27	32	—	51	49	0
55	29	7	100	63	3
144	42	18	337	82	5
284	55	21	675	95	78
731	76	16	742	99	60

Nach F. A. LEE und A. C. WAGENKNECHT, 1955. *Food Res.* **20**, 289

Die beiden Autoren extrahierten aus unblanchierten Gemüsen nach verschiedener Lagerungszeit bei — 18°C die Lipide und bestimmten die Säurezahlen sowie die Peroxydzahlen in diesen Extrakten. Die Freisetzung von Säuren, also die Erhöhung der Säurezahl, ist ein Mass für die Lipasewirkung ; wir sehen aus den Zahlen, dass ein kontinuierlicher Anstieg der Säurezahl zu beobachten war, also eine Lipaseaktivität auch bei — 18°C noch vorlag. Dass auch Lipoxydasen wirksam waren, geht aus der Bestimmung der Peroxydzahl hervor, die ebenfalls im Verlaufe der Lagerungszeit anstieg. In quantitativer Hinsicht, also im Hinblick auf die Höhe dieser Zahlen muss natürlich berücksichtigt werden, dass die Peroxydzahl jeweils nur einen Augenblickszustand wiedergibt, weil die gebildeten und mit der Peroxydzahl erfassten Peroxyde reaktionsfähige Verbindungen sind, die wieder zerfallen, weiter reagieren usw. Natur und Zusammensetzung dieser Produkte sind sehr vielseitig ; sie sind aber wichtig, weil sie häufig geruchs- und geschmacksaktive Eigenschaften haben ; die « Aussagekraft » der Peroxydzahl ist demnach nur beschränkt.

Nun könnte man einwenden, dass gerade bei Gemüsen ein Einfrieren fast immer nur nach einer gewissen Vorbehandlung erfolgt, nämlich dem sogenannten Blanchieren. Mit dieser Wärmebehandlung sollen zwei Ziele erreicht werden :

1. In den meisten Fällen eine gewisse Garung des Lebensmittels.
2. Eine Ausschaltung eben der Enzyme, die zu den genannten Veränderungen beitragen, damit die erwähnten geruchs- und geschmacksaktiven Stoffe, die

sich meistens in Form von off flavour dokumentieren, nicht entstehen. Ein weiterer Effekt des Blanchierens ist auch eine Reduzierung der Keimzahlen.

Dass sich das Blanchieren entsprechend auswirkt, darf ich in der nächsten Tabelle demonstrieren, die zeigt, dass selbst bei sehr langen Lagerungszeiten nach ordnungsgemässem Blanchieren nur sehr geringe Zunahmen von Säurezahl und Peroxydzahl zu beobachten sind. Diese Werte beweisen aber auch, dass die vorher erwähnten Veränderungen der Lebensmittel auf enzymatische Vorgänge zurückzuführen sind ; wären es nichtenzymatische Vorgänge, z.B. bei der Bildung von Peroxyden, so müssten diese Peroxyde auch im blanchierten Gut auftreten.

Abb. 5 *b*. — *SZ und POZ in rohen Lipidextrakten aus Gemusen*
Lagerungstemperatur — 18°C

Gemüse	Lagerungszeit (Jahre)	Behandlung	SZ	POZ
—	—	—	—	—
Spargel	2,5	unblanch.	87	0
—	2,5	blanch.	3	0
—	7,5	unblanch.	84	5
Maïs	2,5	—	46	46
—	2,5	blanch.	2	8
Lima-Bohnen	6	unblanch.	11	4
—	6	blanch.	3	0
—	frisch	unblanch.	3	0
Brechbohnen	6	—	91	24
—	6	blanch.	8	0
—	frisch	unblanch.	8	0
Spinat	6	—	43	34
—	6	blanch.	0	0

Nach F. A. Lee, 1954. *Food Res.* **19**, 515.

Nun ist das Blanchieren eine Hitzebehandlung, die doch einen ziemlich « harten Angriff » auf das jeweilige Gut darstellt und demzufolge auch zu erheblichen Veränderungen des Gutes führen kann, insbesondere dann, wenn sehr lange Blanchierzeiten angewendet werden. Der Hersteller tiefgefrorener Erzeugnisse versucht deswegen natürlich einem Kompromiss zu schliessen, insofern als einerseits die Enzyme praktisch vollständig zerstört werden sollen, andererseits aber die Veränderungen des Gutes durch das Blanchieren eine gewisse Grenze nicht überschreiten sollen. Dazu kommt, dass man ja nicht von « der Lipoxygenase » sprechen kann, oder « der Lipase » ; die einzelnen Gemüse enthalten sehr verschiedene Lipoxygenasen bzw. Lipasen, deren Hitzeempfindlichkeit durchaus sehr unterschiedlich sein kann. So schreibt schon Wagenknecht (16) : « Lipoxydase muss nicht generall als sehr hitzestabil betrachtet werden, die Lipoxydase von Brechbohnen z.B. wurde als sehr thermolabil gefunden. »

Als Beweis dafür, dass selbst innerhalb des selben Produktes die Stabilität der vorliegenden Lipoxydasen verschieden sein kann, soll die nächste Abbildung dienen.

Es wurde hier gefrorener sogenannter « corn on the cob » auf Lipoxydaseaktivität untersucht und zwar in Abhängigkeit von der Blanchierzeit. Die Bestimmungen erfolgten nach 6-monatiger Lagerzeit bei — 18° mit Hilfe einer Warburg-Methode ; als Blanchiermethode war das Dampfblanchieren angewendet worden.

Bei beiden Maissorten reichte eine Blanchierzeit von 4 Minuten nicht aus, um die Lipoxydaseaktivität vollständig zur zerstören. Nach 6 Minuten Blanchierzeit war aber bei der Sorte *Golden Cross* keine Lipoxydaseaktivität mehr festzustellen, während bei der Sorte *Victory golden* noch zum Teil erhebliche Lipoxydaseaktivitäten gefunden werden konnten. Bei dieser Sorte reichte auch ein Blanchieren von 8 Minuten Dauer nicht in allen Fällen aus, um die gesamte Lipoxydaseaktivität zu zerstören.

ABB. 6. — *Auswirkung der Blanchierzeit auf die Lipoxydase-Aktivität in gefrorenem « Mais am Kolben »*

Maissorte	Blanchierzeit mn	Probenzahl	Lipoxydase-Aktivitat*
Victory Golden	4	12	125 (33,..., 202)
	6	5	65 (8,..., 164)
	8	5	6 (0,..., 25)
	10	9	1 (0,..., 3)
	12,5	2	0 (0)
Golden Cross	4	9	75 (36,..., 136)
	6,	2	0 (0)
	7	5	0 (0)
	10	2	0 (0)

*μl O_2-Aufnahme. Mittelwerte (Extremwerte in Klammern) nach A. C. WAGENKNECHT, 1959. *Food Res.* **24**, 539

Dass die Lipoxydasen auch andere Verbindungen als Peroxyde « bilden » können, geht aus Arbeiten von GROSCH (17) und WHITFIELD u.M. (18) hervor, die als Reaktionsprodukte zahlreiche Aldehyde und Ketone identifizieren konnten, und auch den Beweis dafür führten, dass diese enzymatisch entstanden sind ; dabei könnte nach GROSCH auch eine Peroxydase mitbeteiligt sein. Solche Aldehyde und Ketone können aber, was insbesondere bei Erbsen bewiesen wurde, in erheblichem Umfange zu dem off flavour von überlang gelagerten nicht ausreichend blanchierten bzw. roh eingefrorenen Erbsen führen.

SCHLUSS FOLGERUNG

Mit diesen Beispielen über enzymatisch bedingte Veränderungen im tiefgefrorenen Produkt Fisch, Hühnerfleisch und Gemüse wurde zu demonstrieren versucht, dass eine Enzymaktivität auch bei relativ niedrigen Temperaturen noch vorhanden ist und zu entsprechenden Reaktionen führen kann, die dann für die Qualitätserhaltung der gefrorenen Lebensmittel wichtig sind. Dass ich mich dabei insbesondere mit den fettspaltenden Enzymen befasste, liegt daran, dass gerade diese oft die Hauptverantwortung für die Qualitätsverschlechterung in tiefgefrorenen Lebensmitteln haben. Selbstverständlich muss man sich dabei darüber klar sein, dass nicht ausschliesslich diese Fettveränderungen im Zusammenhang mit der Qualitätsverschlechterung betrachtet werden dürfen ; ich hoffe aber doch, dass sie instruktive Beispiele für mögliche und wichtige enzymatische Reaktionen in tiefgefrorenen Produkten sind.

RÉSUMÉ

CHANGEMENTS ENZYMATIQUES DANS LES ALIMENTS CONGELÉS

La congélation est un des procédés les plus importants et les moins nocifs pour la prolongation de la conservation des aliments. Ceux-ci contiennent toutefois des enzymes qui peuvent provoquer différents changements dans les aliments au cours de leur stockage. La congélation n'influe que faiblement sur les enzymes de sorte que celles-ci se trouvent presque inchangées dans le produit congelé. De même la baisse de la température réduit très fortement la vitesse des réactions enzymatiques et le degré de ce ralentissement de vitesse dépend de la nature de l'enzyme considérée. En ce qui concerne la conservation pratique des aliments congelés, les groupes d'enzymes suivants sont les plus intéressants : les protéinases, lipases et lipoxigénases qui se trouvent partout et causent la dégradation des aliments par leurs actions catalytiques. On a pu démontrer que les protéinases pratiquement ne développent plus d'activité enzymatique aux températures d'usage pour le stockage des aliments congelés (— 18°C) alors que les lipases et lipoxygénases gardent parfois une activité restreinte même aux températures très basses et cela spécialement en cas des substrats phospholipidiques. Quelques exemples des publications récentes pour de telles observations (libération d'acides gras au cours du stockage prolongé à basses températures, apparition des produits d'oxydation etc.) sont donnés et l'importance pour la conservation des aliments est discutée.

SUMMARY

ENZYMATIC CHANGES IN FROZEN FOODS

Deep freezing is one of the most important and the least noxious processes of prolonging the quality of foods. The latter, however, contain enzymes which can keeping produce different changes in foods during storage. The freezing process itself has a slight effect on enzymes so that they are, at least in part, unchanged in the frozen product. The lowering of temperature also greatly reduces the speed of enzymatic reactions and the degree of this decrease in speed depends on the nature of the enzyme considered. With regard to the practical preservation of frozen foods the following groups of enzymes are the most interesting : proteinases, lipases and lipoxygenases, which are omnipresent and cause in particular, by their catalytic actions, the degradation of foods. It has been possible to demonstrate that at the usual temperatures of stored frozen foods (— 18°) the enzymatic activity of proteinases practically stops developing, lipases and lipoxydases retain a slight activity, especially vis-à-vis phospholipidic substrates, even at very low temperatures. Examples of recent publications for such observations (liberation of fatty acids during prolonged storing at low temperatures, appearance of products of oxydation, etc.) are given, and their importance in the preservation of deep frozen foods is discussed.

LITERATUR

(1) Pallavicini C., 1970. *Ref. Food Sci. Technol. Abstr.* **2**, 2 114.
(2) Kiermeier F., 1952. *Naturwiss.* **39**, 323.
(3) Joslyn M. A., 1949. *Adv. in Enzymology*, Vol. **9**, S. 613-652 (New York) 1949.
(4) Davidkova E., Khan A. W., 1967. *J. Food Sci.* **32**, 35.
(5) Dyer W. J., 1967. *Cryobiology*, **3**, 297.
(6) El Gharbawi M. J., Dugan L. R., 1965. *J. Food Sci.*, **30**, 817.

(7) Lovern J. A., 1962. Rec. Adv. in *Food Sci.*, Vol. **1**, p. 194, 199 (New York).
(8) Ackmann R. G., 1967. *Food Technol.* **2**, 169.
(9) Anderson A. W., Steinberg M. P., 1964. *J. Food Sci.*, **29**, 327.
(10) Hanson S. W. F., Olley J., 1965. *The Technology of Fish Utilisation*, 1965, p. 111, Ed. by R. Kreuzer (London).
(11) Hamosh M. R., Atia R., Shapiro B., 1966. *J. Food Sci.*, **31**, 146.
(12) Bligh E. G., Scott M. A., 1966. *J. Fish. Res. Board Can.* **23**, 1025.
(13) Lauders I. T., Mac Callum W. A., 1970. *J. Fish. Res. Board Can.* **27**, 1589.
(14) Bengtsson B., Bosund I., 1966. *J. Food Sci.*, **31**, 474.
(15) Lee F. A., Wagenknecht A. C., 1955. *Food Res.*, **20**, 289.
(16) Wagenknecht A. C., 1959. *Food Res.*, **24**, 539.
(17) Grosch W. Z., 1966. *Z. Lebensm. Unters. u. Forsch.* **135**, 75.
(18) Whitfield F. B., Shipton J., 1966. *J. Food Sci.*, **31**, 328.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 515-533.

METABOLITISCHE AUSTAUSCHREAKTIONEN VON ENZYMEN UND INSEKTIZIDEN WÄHREND DER GETREIDELAGERUNG

F. MEUSER

Technische Universität Berlin
Seestrasse 11, Postfach 650480
D-1, Berlin 65 (R. F. A.)

ZUSAMMENFASSUNG

Im Zustand der relativen Stoffwechselruhe sind im Getreidekorn für Stoffwechselreaktionen des Keimungsvorganges notwendige Enzyme potentiell aktiv. Die Enzyme sind im wesentlichen in der Aleuronschicht und im Keimling lokalisiert. Das Getreide kann unterhalb der Auskeimbedingungen in den von der Wasseraktivität abhängigen Grenzen sowohl aus Zuckern als auch aus Fetten und Aminosäuren Energie gewinnen. Einige der an diesen Stoffwechselprozessen beteiligten Enzyme sind genügend unspezifisch, um Schädlingsbekämpfungsmittel und deren Rückstände abbauen zu können. Diese Wirkung kann durch die Mikroorganismen des Getreides, welche die Fähigkeit haben, Fremdstoffe als Substrate anzunehmen, verstärkt werden.

Wie am Beispiel des Phosphorwasserstoffs gezeigt wird, ist aber insbesondere bei gasförmigen Schädlingsbekämpfungsmitteln zur Anwendungszeit ein geringer Getreidestoffwechsel notwendig. Diese Mittel können durch Enzymhemmungen einen erheblichen Einfluss auf die Lebensfähigkeit des Samens gewinnen. Hingegen ist eine leicht erhöhte Wasseraktivität für den Abbau von Rückständen erstrebenswert. Dies gilt insbesondere für den Abbau von Phosphorsäureestern, wie am Beispiel von Malathion dargestellt wird. Chlorierte Kohlenwasserstoffe lassen sich über den Stoffwechsel des Getreides kaum abbauen ; darauf beruht deren Persistenz. Erst unter anaeroben Lagerbedingungen wird z. B. DDT reduktiv abgebaut.

EINLEITUNG

Pestizide können im pflanzlichen und tierischen Organismus einem metabolitischen Abbau unterliegen, dessen Art und Ausmass von den Enzymsystemen und der Enzymaktivität der Gewebe bestimmt wird. Auch im Getreidekorn können Schädlingsbekämpfungsmittel über Stoffwechselvorgänge abgebaut werden. Der

Abbau kann aber nur in den für die Getreidelagerung vorgegebenen Anregungsgrenzen des Stoffwechsels erreicht werden, die durch die Bedingung der Lagerfestigkeit des Getreides beschränkt werden. Zum besseren Verständnis kinetisch möglicher Austauschreaktionen von Enzymen mit Vorratsschutzmitteln und deren Wirkung auf den Stoffwechsel ist es deshalb zunächst notwendig, kurz auf die in diesem Zusammenhang interessierenden biochemischen und physikalischen Eigenschaften des lagernden Getreidekorns einzugehen.

BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES GETREIDEKORNS

In der Abb. 1 ist die Aktivität des Stoffwechsels in den Lebensphasen des Getreidekorns schematisch aufgezeigt. In der Endphase der Reifung nimmt der Same den Zustand der Lagerfähigkeit durch eine abnehmende Stoffwechseltätigkeit an

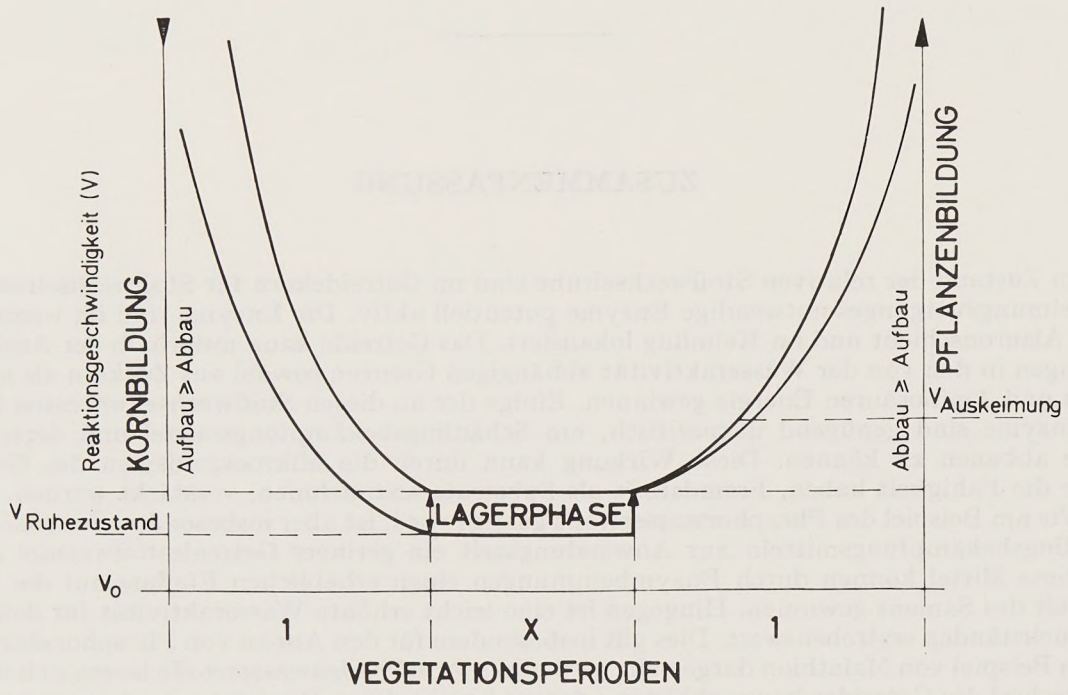


Abb. 1. — *Aktivität des Stoffwechsels in den Lebensphasen des Getreidekorns.*

und verharrt bei einem geringen Grundumsatz in relativer Ruhe bis zur Pflanzenneubildung. Das Getreidekorn wird von der Pflanze in seiner ganzen Anlage auf die Bildung dieser neuen Pflanze organisiert. Die zur Pflanzenbildung notwendigen energieverbrauchenden Synthesereaktionen werden enzymatisch katalysiert. Die dazu erforderlichen Enzyme werden zum Teil schon im Verlauf des Pflanzen- und Kornwachstums synthetisiert ; sie sind im ruhenden Getreidekorn potentiell aktiv. In der Tabelle 1 sind insbesondere solche Enzyme des Citronensäure- sowie Pentosephosphatcyclus und der Glykolyse zusammengestellt, die für den Stoffwechsel von Pflanzen wichtige Schlüsselstellungen einnehmen (1, 2, 3). Bemerkenswert hoch ist die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und der Alkohol-Dehydrogenase sowohl im Embryo des Weizens als auch im Embryo und Restkorn

der Gerste. Insbesondere auf diese beiden Enzyme werden wir noch einmal zurückkommen. Es ist aber anzumerken, dass trotz der hohen Aktivität glykolytischer Enzyme das ruhende Getreide seine Energie nicht ausschliesslich aus der Glykolyse

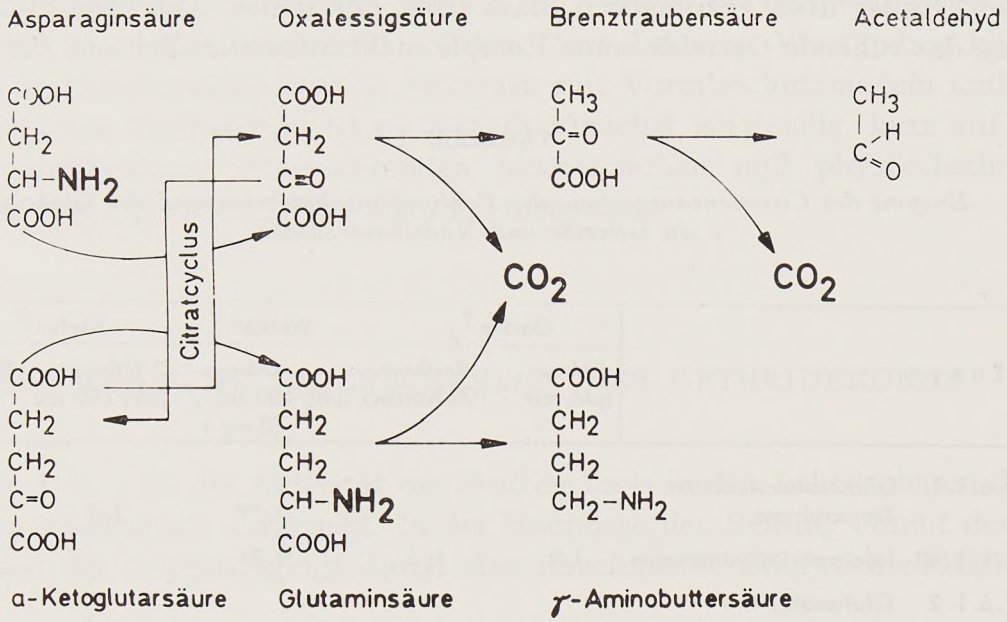
TABELLE I

Enzyme des Citronensäure-sowie des Pentosephosphatcyclus und der Glykolyse in Getreide-und Nadelbaumsamen

Enzym		Gerste [1]		Weizen [2]	Kiefer [3]	
		Embryo (µM/min · 100 Körner)	Restkorn	Embryo (µM/100 sec./ 20 mg)	Embryo (µM/100 sec · 1 Same)	Endosperm
EC 2.6.1.1	Glutamatoxalacetat-Transaminase			0,29	2,0	4,0
EC 1.1.1.42	Isocitrat-Dehydrogenase	1,1	1,6	0,24		
EC 2.6.1.2	Glutamatalanin-Transaminase				1,0	1,0
EC 1.1.1.37	Malat-Dehydrogenase	87	23		40	94
EC 1.1.1.49	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0,55	0,65	0,40		
EC 1.1.1.44	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	0,3	0,5			
EC 2.4.1.1	Phosphorylase	0,1	0,1			
EC 2.7.1.1	Hexokinase	0,6	0,5	0,13		
EC 2.7.5.1	Phosphogluco-Mutase	1,5	1,5			
EC 5.3.1.9	Glucose-6-phosphat-Isomerase	19	14			
EC 4.1.2.7	Aldolase	2,1	2,6	0,57	0,49	0,65
EC 1.2.1.12	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	20	13	3,79	0,15	0,68
EC 5.3.1.1	Triosephosphat Isomerase				74	52
EC 2.7.1.40	Pyruvat-Kinase	3,5	2,7	0,44		
EC 1.1.1.1	Alkohol-Dehydrogenase	90	25	3,46	0,13	0,15
EC 1.1.1.27	Lactat-Dehydrogenase				0,85	0,26
EC 1.1.1.6	Glycerin-Dehydrogenase	nicht nachweisbar				

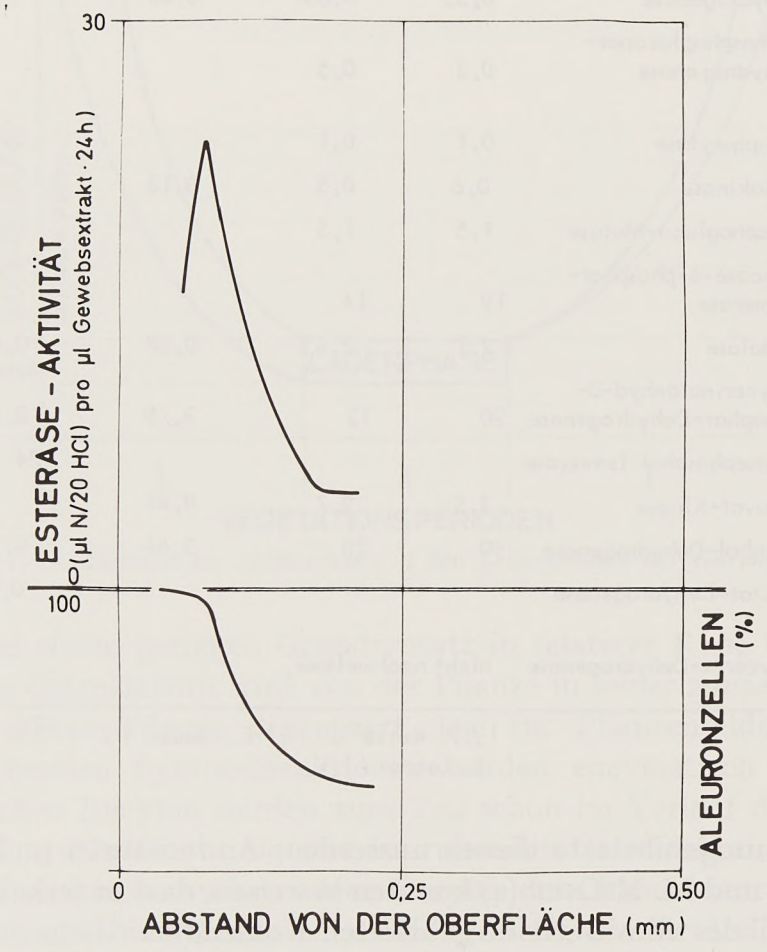
[1] J. P. Kotzé u. E. Latzko (1) [2] F. Meuser (2) [3] H. Bartels (3)

bezieht. Als Atmungssubstrate dienen ausserdem Aminosäuren und wahrscheinlich Fette. P. Linko und M. Milner (4) konnten beweisen, dass unterhalb 20 p. 100 Wassergehalt ein Teil des vom Getreide gebildeten Kohlendioxids aus der Decarboxylierung von Glutaminsäure stammt. In der Abb. 2 sind die möglichen Reaktionsschritte dargestellt. Durch Transamination von Asparaginsäure mit α-Ketoglutarsäure entstehen Oxalessigsäure und Glutaminsäure. Diese werden zu Brenztraubensäure bzw. zu



P. Linko u. M. Milner (4)

Abb. 2. — *Mögliche Transaminierungs-und Decarboxylierungs-Reaktionen im Keimling*



Chr. Engel (6)

Abb. 3. — *Verteilung von Esterase in den äusseren Schichten des Weizenkorns*

γ-Aminobuttersäure decarboxyliert (5). Ausserdem sind viele andere Enzyme aktiv bzw. durch physikalische Einflüsse aktivierbar, die im ruhenden Getreidekorn sowohl oxidative als auch hydrolytische und decarboxylierende Reaktionen katalysieren. Die Enzyme sind — wie erwähnt — hauptsächlich auf den Embryo mit Scutellum und auf die Aleuronschicht verteilt. Das Endosperm hat nur einen geringen Enzymgehalt. In der Abb 3 ist z. B. die Verteilung der Esterase in den äusseren Schichten des Weizenkorns aufgezeigt (6). Die Esterase-Aktivität geht in Abhängigkeit von der Abnahme des Aleuronzellenanteils in der Oberfläche zurück. Ähnlich ist auch die Aktivität der Proteinasen und Dipeptidasen verteilt.

Die Anhäufung von Enzymen in den äusseren Schichten und im Embryo des Getreidekorns begünstigt den biochemischen Abbau von Schädlingsbekämpfungsmitteln.

PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DES GETREIDEKORNS

Biochemische Reaktionen werden im Getreide im wesentlichen durch die Veränderung der Feuchtigkeit, der Temperatur und der Zusammensetzung der Atmosphäre hervorgerufen. Auf jede der genannten Einflussgrössen reagiert das Getreide aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften in spezifischer Weise. Besonders hervorzuheben ist das Sorptionsverhalten des Getreides. Das Getreidekorn ist ein kapillar-poröser kolloider Körper ; sein Makro- und Mikrokapillarsystem bildet mit der äusseren Oberfläche die aktive Oberfläche des Getreides. Die aktive Oberfläche des Korns beträgt hinsichtlich der Wasserdampfsorption 200 bis 250 m^2/g (7). Die Wasserdampfsorption wird aber hauptsächlich von der chemischen Zusammensetzung des Kornes bestimmt ; deshalb kann nicht nur von einer monomolekularen Oberflächenbesetzung ausgegangen werden. Die Wasserdampfsorption ist damit nur mit Vorbehalt ein Mass für die Oberfläche. Daher wird die spezifische Oberfläche besser durch die Adsorption nichtpolarer Gase charakterisiert. Für Weizen wurde durch Stickstoffadsorption eine Oberfläche von 0,095 3 m^2/g berechnet (8). Dieser Wert ist 2 000 mal kleiner als der für die Wasserdampfsorption. Die Gasadsorption ist in diesem Zusammenhang für die Sorption gasförmiger Schädlingsbekämpfungsmittel von Interesse. Manche dieser Gase können von Getreide chemisorbiert werden.

Die Wasserdampfsorption steht ausserdem in enger Verbindung zum hygroskopischen Verhalten des Kornes. An dieser Stelle wird die Abhängigkeit des Stoffwechsels von den physikalischen Eigenschaften besonders deutlich. Die Hygroskopizität dient als Regelmechanismus für das wässrige Medium, in dem alle metabolitischen Reaktionen ablaufen. Das Wasser löst Substrate und Enzyme. Über Hydratation und Lösen von Eiweisskörpern wird der osmotische Druck reguliert. In diersem Zusammenhang ist zu beachten, dass das Getreidekorn ein lebender Organismus ist : im Korn werden in Wechselwirkung mit dem Anregungszustand des Stoffwechsels sorbierte Stoffe in den Kapillaren und Geweben des Kornes aktiv verteilt. Letzteres ist besonders im Hinblick auf den Transport von Vorratsschutzmitteln wichtig (9, 10).

Bei konstanter Temperatur besteht ein Zusammenhang zwischen der Feuchtigkeit des Lagergutes und der relativen Luftfeuchtigkeit. Diese Abhängigkeit kann in Form von Sorptionsisothermen beschrieben werden (Abb. 4) (11). Der maximale Gleichgewichtswassergehalt im Getreide wird bei einer Wasseraktivität von 1,0 erreicht. Dieser Fall kommt in der Lagerungspraxis nur unter extremen Bedingungen vor.

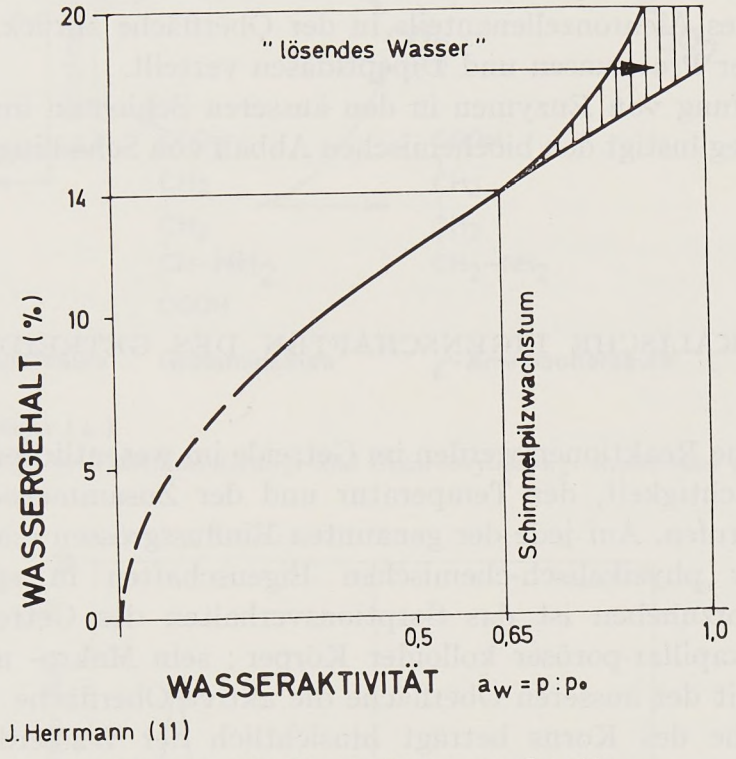


ABB. 4. — *Sorptionsisotherme von Getreide*

Aber schon im konkaven Teil der Kurve kann bei steigender rel. F. eine mit Dampfdruckerniedrigung verbundene Kapillarkondensation von Wasser eintreten. Die kondensierte Wassermenge entspricht in der Abbildung 4 der als schraffiert dargestellten Fläche. Deshalb ist schon bei monomolekularer Wasserdampfbesetzung der Oberfläche mit freiem Wasser zu rechnen. Dieses kann als Medium für Lösungs- und Diffusionsvorgänge genutzt werden. Bei einer Wasseraktivität von $a_W = 0{,}65$ beginnt auch das Schimmelpilzwachstum.

Aus diesen Ausführungen geht deutlich hervor, dass dem Wasser und der Zusammensetzung der Atmosphäre entscheidende Funktionen für die Induktion von Stoffwechselreaktionen zukommen. Ihr Vorhandensein bestimmt sowohl die Art als auch den quantitativen Verlauf des Stoffwechsels. Unterhalb des Schwellwertes zur Auskeimung kommen in Abhängigkeit variierender Umweltbedingungen hauptsächlich zueinander nicht geregelte enzymatisch katalysierte Reaktionen vor (Abb. 1), sie führen häufig zu einem schnellen Verlust der Vitalität des Samens. Dies kann mit einer Wertminderung der Inhaltsstoffe im Hinblick auf die Verarbeitung verbunden sein. In diesen Bereich fallen auch die Austauschreaktionen zwischen Enzymen und Vorratsschutzmitteln.

Die Kinetik vorgenannter Reaktionen und Prozesse kann unter konstanten äusseren Bedingungen als Zeitfunktion entsprechend den drei in der Abb. 5 typischen

Kurven dargestellt werden. Kurve 1 zeigt eine enzymatische Reaktion, bei der das Endprodukt nicht weiter abgebaut wird. Der erste Teil der Kurve ist bei hoher Substratkonzentration geradlinig. Im weiteren Verlauf nähert sie sich bei Endproduktthemmung oder Substratverbrauch asymptotisch einem Endwert. Kurve 2

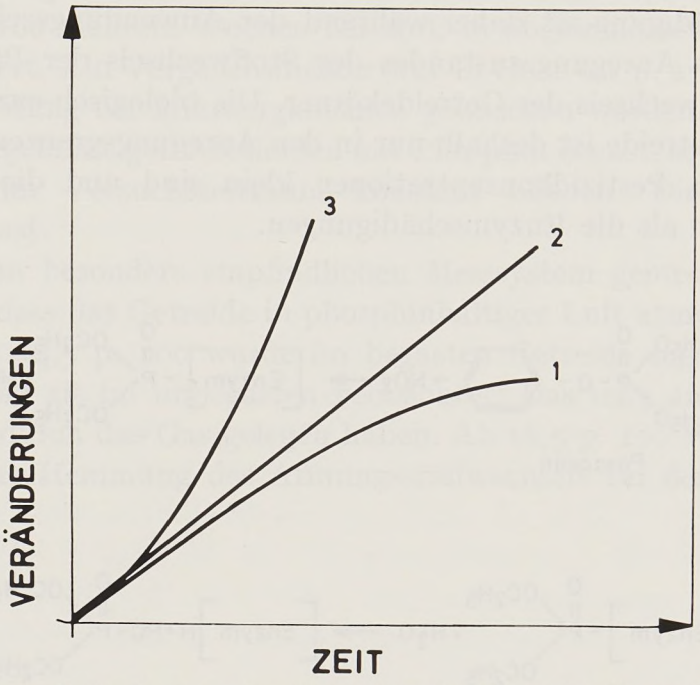


Abb. 5. — *Veränderungen im Getreidekorn in Abhängigkeit von der Zeit*

kann eine Reaktion 0. Ordnung sein. Das gilt z. B. für Fliessgleichgewichtsreaktionen. Kurve 2 geht in Kurve 3 über, wenn eine autokatalytisch beschleunigte Reaktionszunahme zu verzeichnen ist. Der exponentielle Anstieg von Keimzahlen und eine damit verbundene adäquate Atmungsintensität ist ein charakteristisches Beispiel.

WECHSELWIRKUNG VON ENZYMEN UND VORRATSSCHUTZMITTELN IN LAGERNDEM GETREIDE

Diese schematisch gegebenen Reaktionsweisen sollen im Folgenden an konkreten Beispielen aufgezeigt werden. Wir müssen dazu zwei verschiedene, aber nicht streng voneinander zu trennende Gesichtspunkte betrachten. Einmal ist die Wirkung von Insektiziden auf den Stoffwechsel zu sehen und zum andern ist der Einfluss von Enzymen auf Insektizide darzustellen.

WIRKUNG VON INSEKTIZIDEN AUF DEN STOFFWECHSEL

Es ist bekannt, dass die meisten Insektizide als Enzyminhibitoren wirken. Insekten werden zum Beispiel durch organische Phosphorsäureester über die Hemmung von Cholinesterasen sowie anderen Enzymen vergiftet (12). Dabei wird das Enzym

durch Phosphorylierung biologisch inaktiviert, so dass lebenswichtige Reaktionen im Organismus nicht mehr gesteuert werden können (Abb. 6). Die Regenerierung des Enzyms durch enzymatische Hydrolyse geht so langsam vor sich, dass die Insekten in der Anwendungszeit des Insektizids abgetötet werden. Die gleichen Enzymhemmungen können Insektizide auch im pflanzlichen Organismus hervorrufen. Das Ausmass der Schädigung ist dabei während der Anwendungszeit im wesentlichen eine Funktion des Anregungszustandes des Stoffwechsels der Pflanze, in unserem Falle die des Stoffwechsels der Getreidekörner. Die biologisch-enzymatische Dekontamination von Getreide ist deshalb nur in den Anregungsgrenzen des Stoffwechsels möglich, in denen Pestizidkonzentrationen klein sind und die Abbaureaktionen schneller verlaufen als die Enzymschädigungen.

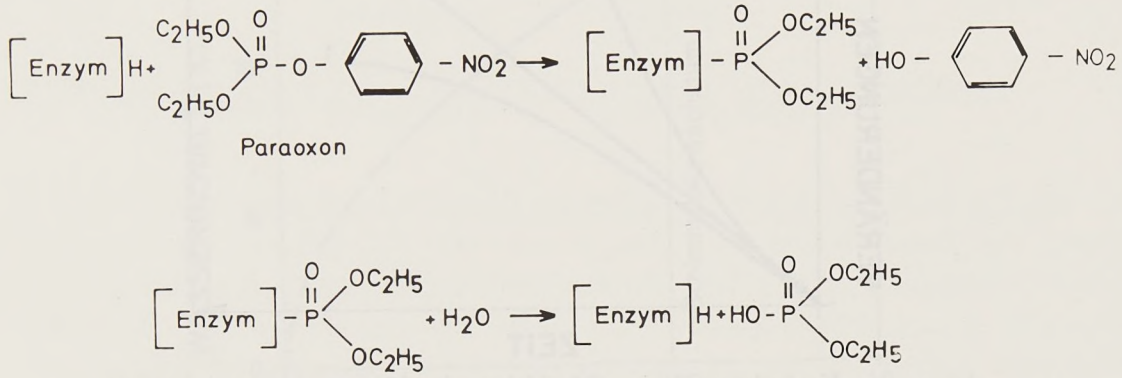


Abb. 6. — *Inhibierung und Regenerierung eines Enzyms*

Da insbesondere gasförmige Schädlingsbekämpfungsmittel auf den Getreidestoffwechsel stark giftig wirken, ist für ihre Anwendung ein sehr geringer Stoffwechsel des Getreides im Verhältnis zu dem der Insekten Voraussetzung. Diese Bedingung kann z. B. nicht gewährleistet werden, wenn Getreide mit einem hohen Wassergehalt kurzfristig gelagert wird.

In diesem Zusammenhang sei auf die Versuche von S. A. Matz und M. Milner (13) hingewiesen. Die Autoren begasten feuchtlagernden Weizen u. a. mit Propylenoxid und Tetrachlorkohlenstoff. Über die Hemmung des Stoffwechsels von Mikroorganismen und des Getreides sollte letzteres vor Qualitätsverlusten bewahrt werden. Auf diese Weise konnte die Atmung gehemmt, die Zunahme der Fettacidität und Abnahme der Backqualität verzögert werden. Propylenoxid setzte aber die Lebensfähigkeit des Samens herab. Eine Behandlung feuchtlagernden Getreides insbesondere mit gasförmigen Insektiziden sollte deshalb möglichst vermieden werden. Am Beispiel von Phosphin ist von uns gezeigt worden, dass irreversible Stoffwechselveränderungen vorkommen können (14). Da ähnliche Stoffwechseleingriffe auch bei anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln denkbar sind, soll im Folgenden die Wirkung von Phosphin auf den Getreidestoffwechsel dargestellt werden.

Zur Bestimmung des Einflusses des Gases auf die Stoffwechseltätigkeit ist Weizen in verschiedenen Anregungszuständen begast worden. Die dadurch hervor-

gerufenen Veränderungen im Stoffwechselgeschehen sind gegenüber nichtbegasten Kontrollproben anhand des Gasaustausches, der Enzymaktivität und an Stoffwechselprodukten festgestellt worden.

Die Veränderung des Anregungszustandes des Getreidestoffwechsels haben wir über die CO_2-Bildung ermittelt. Weizen wurde mit einem Wassergehalt von 14,5, 16,5 und 18,5 p. 100 mehrere Wochen bei 20°C in abgeschlossenen Probekammern im Dunkeln gelagert. Ein Vergleichsmuster war in einer 0,1 p. 100 igen 8-Oxychinolinlösung zur Abtötung der Mikroorganismen gewaschen worden. Je eine Versuchscharge wurde in regelmässigen Abständen mit Phosphin begast, so dass die Phosphinkonzentrationen im Versuchszeitraum konstant blieben. Die Vergleichsmuster wurden nicht begast.

Die mit einem besonders empfindlichen Messsystem gemessenen CO_2-Mengen liessen erkennen, dass das Getreide in phosphinhaltiger Luft atmen kann. Bei einem Wassergehalt von 14,5 p. 100 wurde im begasten Getreide sogar eine geringfügig höhere CO_2-Bildung als im unbegasten beobachtet. Das mag an einer Stimulation des Stoffwechsels durch das Gas gelegen haben. Ab 16,5 p. 100 Wassergehalt wurde aber eine deutliche Hemmung des Atmungsstoffwechsels bei den begasten Proben

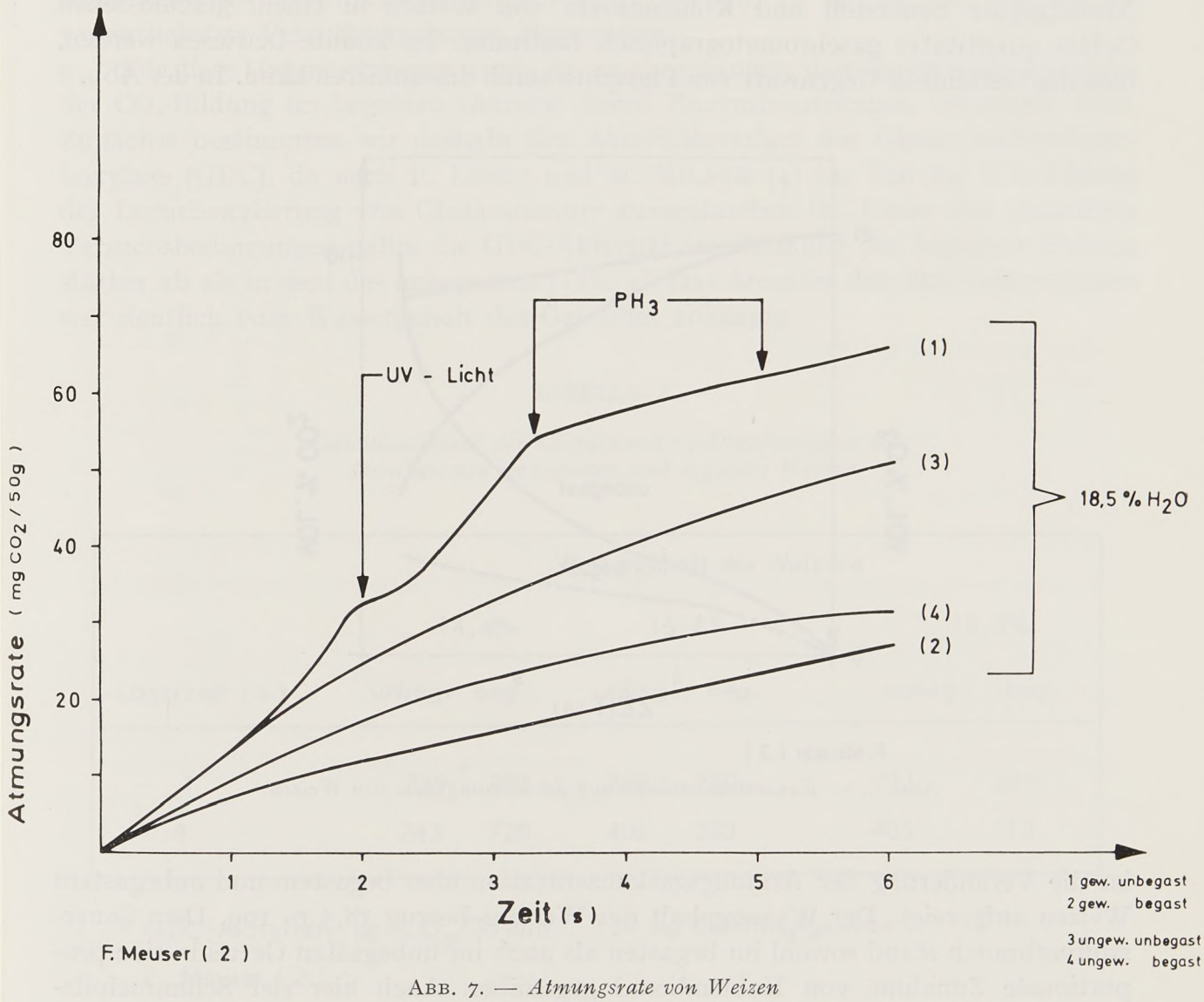


ABB. 7. — *Atmungsrate von Weizen*

gegenüber den unbegasten festgestellt. Die CO_2-Bildung des Weizens mit 18,5 p. 100 Wassergehalt war stark verringert (Abb. 7). In diesem Wassergehaltsbereich wurde auch das Schimmelpilzwachstum völlig verhindert. — Ab einer Wasseraktivität $a_W = 0{,}65$ haben Schimmelpilze auf und im Getreide genügend Wasser zur Verfügung um ihr Zellplasma zur vollen Lebensfähigkeit zu hydratisieren. Damit sind die Diffusionswiderstände für den lebensnotwendigen Gasaustausch soweit herabgesetzt, dass bei Anwesenheit von Phosphin ihr Stoffwechsel vollkommen gehemmt wird. — Die Atmungskurve des gewaschenen, zunächst unbegasten Getreides zeigt deutlich die durch das Schimmelpilzwachstum hervorgerufene Atmungssteigerung. Die CO_2-Bildung hat den Verlauf einer biologischen Wachstumskurve. Die exponentielle Zunahme der CO_2-Bildung wurde durch das Wachstun der Schimmelpilze hervorgerufen. Der Weizen wurde am 13. Lagertag 15 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Die dadurch erfolgte Abtötung der Mikroflora an der Oberfläche des Getreides bedingte einen Wendepunkt in der CO_2-Bildung, der nach zwei Tagen durch das Wachstum der überlebenden Schimmelpilze überwunden war. Begasen des Weizens mit Phosphin am 24. bis 35. Lagertag ergab einen neuen Wendepunkt, der den starken Einfluss des Begasungsmittels auf die Schimmelpilze erkennen lässt.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurde die Konzentrationsänderung der Atmungsgase Sauerstoff und Kohlendioxid von Weizen in einem geschlossenen Gefäss quantitativ gaschromatographisch bestimmt. Es konnte bewiesen werden, dass das Getreide in Gegenwart von Phosphin aerob dissimilieren kann. In der Abb. 8

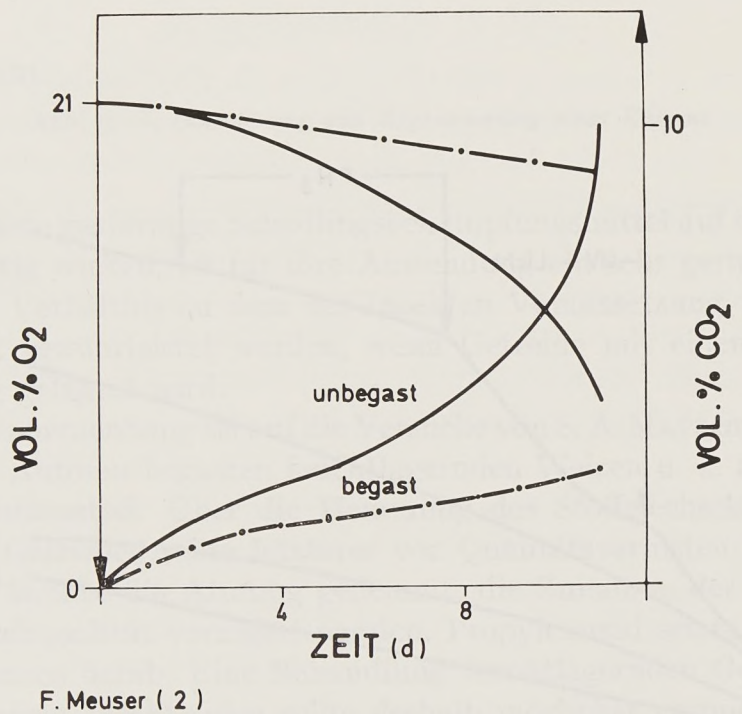


Abb. 8. — *Konzentrationsänderung der Atmungsgase von Weizen*

ist die Veränderung der Atmungsgaskonzentration über begastem und unbegastem Weizen aufgezeigt. Der Wassergehalt des Weizens betrug 18,5 p. 100. Dem Sauerstoffverbrauch stand sowohl im begasten als auch im unbegasten Getreide eine proportionale Zunahme von Kohlendioxid gegenüber. Auch hier rief Schimmelpilz-

wachstum im unbegasten Getreide eine exponentielle Veränderung der Atmungsgase hervor, während im begasten Getreide eine konstante Veränderung beobachtet wurde. Der Atmungsquotient hatte für beide Versuche etwa den Wert 1,0.

Aus dem Atmungsquotienten kann nun geschlossen werden, dass auch das begaste Getreide aerob dissimilierte. Während einer 12-wöchigen Versuchsdauer bei 18,5 p. 100 Wassergehalt war entsprecheud der geringeren Atmungstätigkeit die ATP- Phosphorylierung kleiner als in unbegastem Getreide. Im Keimling (150 mg) des unbegasten Getreides waren nach neun Wochen 90 µg ATP und in dem des begasten 60 µg ATP vorhanden. Neben der Aerobiose muss aber unter den Versuchsbedingungen zumindest in gewissen Gewebsschichten des begasten Getreides eine anaerobe Dissimilation vorgelegen haben, denn es war eine geringe, aber signifikante Äthanolbildung zu verzeichnen. Der Äthanolgehalt stieg im Keimling in zehn Wochen von 0 auf 16,9 µg/100 mg.

Da die Gaswechselmessungen keine näheren Hinweise auf die Wirkungsart des Gases geben konnten, wurde die Einwirkung des Gases auf die Aktivität bestimmter Enzyme ermittelt. Dazu haben wir den Aktivitätsverlauf verschiedener Enzyme des Aminosäurestoffwechsels, des Tricarbonsäurecyclus und der Glykolyse während der Versuchsdauer gemessen. Auf diese Weise konnte ein Einblick in den Wirkungsmechanismus des Stoffwechseleingriffs erlangt werden. — Es sei hier nur auf die wesentlichsten Versuchsergebnisse hingewiesen.

Für diese Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass die grössere Abnahme der CO_2-Bildung im begasten Getreide durch Enzymhemmungen verursacht wird. Zunächst bestimmten wir deshalb den Aktivitätsverlauf der Glutaminsäuredecarboxylase (GDC), da nach P. Linko und M. Milner (4) ein Teil der CO_2-Bildung der Decarboxylierung von Glutaminsäure zuzuschreiben ist. Unter den genannten Versuchsbedingungen nahm die GDC-Aktivität im Keimling des begasten Weizens stärker ab als in dem des unbegasten (Tab. 2). Das Ausmass des Aktivitätsverlustes war deutlich vom Wassergehalt des Getreides abhängig.

TABELLE 2

Aktivitätsverlauf der Glutaminsäure-Decarboxylase im desinfizierten unbegasten und begasten Weizen

	Wassergehalt des Weizens					
	14,6%		16,4%		18,5%	
Lagerzeit (s)	unbeg.	beg.	unbeg.	beg.	unbeg.	beg.
1	729 +	824	769	720	711	689
8	743	720	405	203	405	113

+ GDC-Aktivität: µg CO_2/30 min . 150 mg Keimlingsgewebe

F. Meuser (2)

Da die Aktivität der glykolytischen Enzyme bis auf die der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) relativ konstant blieb, ist anzunehmen, dass bis zu einem Wassergehalt von 20 p. 100 des Getreides ein Teil der Atmungsminderung im Aktivitätsrückgang der GDC begründet ist. Ein weiterer Grund für die nachlassende CO_2-Bildung liegt sicherlich in der durch die Abnahme der ADH-Aktivität verursachten Einschränkung der Glykolyse über eine verringerte Oxidation des reduzierten Nikotinamidnukleotids (NADH). Darauf weist auch der Anstieg der GAPDH-Aktivität im begasten Getreide hin (Tab. 3). Sie ist damit zu erklären,

TABELLE 3

Aktivität glykolytischer Enzyme im Keimlingsgewebe unbegasten und begasten Weizens

Enzym-Aktivität (µ Mol/100 sec . 20 mg . 25°C)	Lagerzeit (s)	Weizen (18,2% H_2O) unbegast	begast
Hexokinase EC 2.7.1.1	1	0,10	0,11
	9	0,11	0,12
Aldolase EC 4.1.2.7	1	0,43	0,40
	9	0,30	0,19
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase EC 1.2.1.12	1	2,47	2,48
	9	1,20	3,80
Pyruvat-Kinase EC 2.7.1.40	1	0,40	0,40
	9	0,35	0,45
Alkohol-Dehydrogenase + EC 1.1.1.1	1	17,4	15,4
	9	13,5	7,2

+ (µ Mol/100 sec . 150 Keimlinge . 25°C)

F. Meuser (2)

dass ein Ausweg für die Adenosintriphosphat-Bildung (ATP) notwendig wurde. Eine Aktivitätssteigerung der GAPDH muss zu einer verstärkten Phosphoglycerinsäure-phosphat-Bildung geführt haben. Auf dieser Stufe kann dann die auch im begasten Getreide anhand der steigenden ATP-Menge im Zellgewebe des Keimlings beobachtete Phosphorylierung des Adenosindiphosphats erfolgt sein. Die ATP-Menge stieg zwischen der 1. und 9. Lagerwoche im Keimling (150 mg) des unbegasten Getreides von 42 bis 90 µg und im begasten von 15 bis 60 µg.

Oberhalb 21 p. 100 Feuchtigkeit ist der Getreidestoffwechsel so stark angeregt, dass durch Phosphin irreversible Schädigungen lebensnotwendiger Enzyme eintreten. Dabei kann Phosphin entweder SS-Bindungen reduzieren oder sich mit Metallproteinen verbinden. J. B. Robinson und F. J. Bond (15) konnten zeigen, dass Phosphin Cystin langsam reduziert und bei der Reduktion Sauerstoffsäuren des Phosphors gebildet werden. Eine biochemische Oxidation in feuchtem Getreide war schon von uns anhand der Konzentrationsabnahme von Phosphin im geschlossenen Lagergefäss postuliert worden. Die Oxidationsgeschwindigkeit des Gases war beim höchsten Anregungszustand des Getreidestoffwechsels am grössten. Gleichzeitig war aufgrund der geringen Löslichkeit die Konzentration des Phosphins im feuchtesten Getreide am geringsten (Abb. 9).

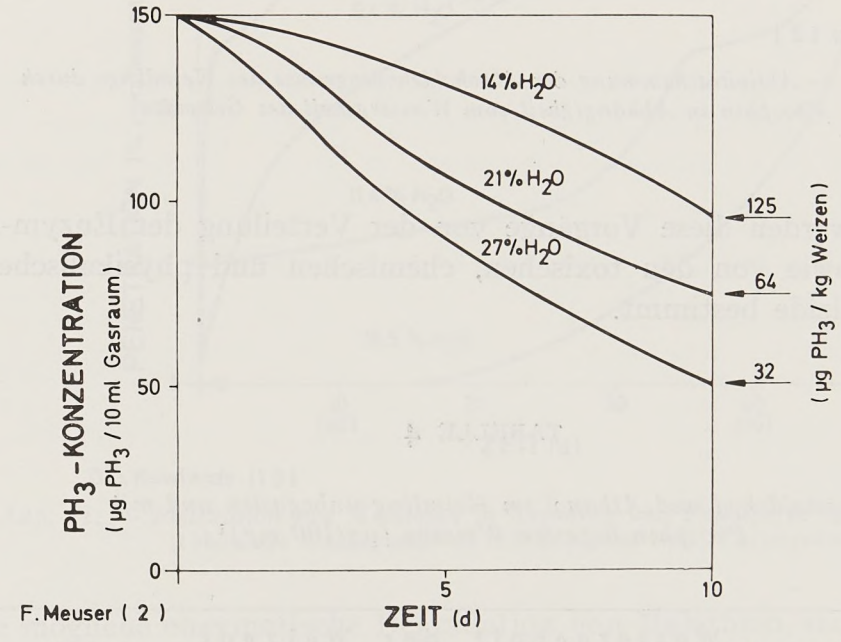


Abb. 9. — *Veränderung der pH_3-Konzentration in Abhängigkeit vom Wassergehalt des Lagergutes*

Die wahrscheinliche Bindung des Phosphins an Metallatome von Proteinen führt zum Beispiel bei dem für die Enzymkatalyse essentiellen Zinkatom der Alkoholdehydrogenase zu einem vollständigen Verlust der ADH-Aktivität.

Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen verlor das Enzym Alkoholdehydrogenase — abhängig vom Hydratationszustand des Getreides — an Aktivität (Abb. 10). Der Verlust der ADH-Aktivität führte im begasten Getreide zu einer Acetaldehydanhäufung. Im unbegasten Getreide war unter den Versuchsbedingungen eine Reduktion zu Äthanol eingetreten (Tab. 4). Da die Reduktion des Acetaldehyds mit der Oxidation der Pyridinnucleotide verbunden ist, wurde durch den Aktivitätsverlust der ADH der glykolytische Abbauweg vollständig inhibiert.

Die vorangegangenen Ausführungen zeigen, dass der Einfluss von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf den Stoffwechsel und die mögliche Dekontamination durch Enzyme eine Funktion des Anregungszustandes des Getreidestoffwechsels ist.

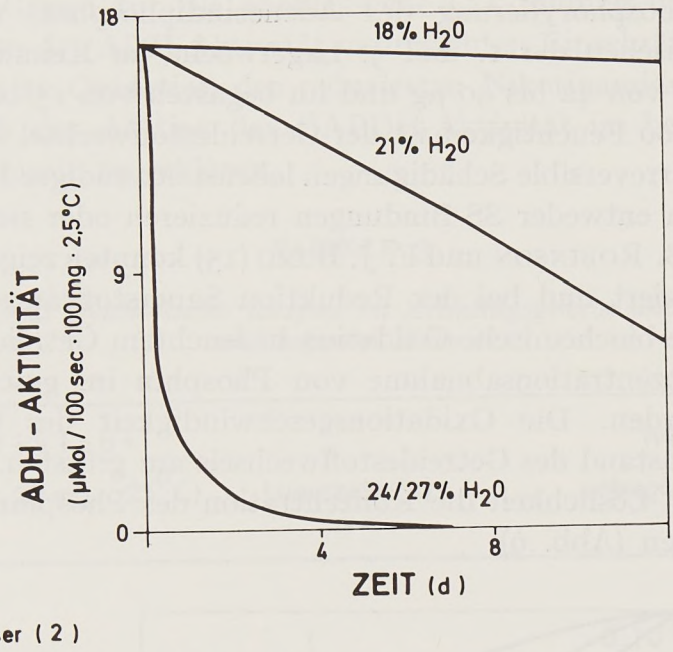


ABB. 10. — *Aktivitätshemmung der Alkoholdehydrogenase des Keimlings durch Phosphin in Abhängigkeit vom Wassergehalt des Getreides*

Darüber hinaus werden diese Vorgänge von der Verteilung der Enzym-Aktivität zum Wirkstoff sowie von den toxischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften der Pestizide bestimmt.

TABELLE 4

Acetaldehyd und Athanol im Keimling unbegasten und mit Phosphin begasten Weizens (µg/100 mg)[1]

Lagerzeit	Wassergehalt des Weizens							
	24 %				27 %			
	unbegast		begast		unbegast		begast	
(d)	Acetald.	Äthanol	Acetald.	Äthanol	Acetald.	Äthanol	Acetald.	Äthanol
1	30	n.n.	30	n.n.	45	25	45	25
7	52	12	94	8	58	22	126	20
12	23	23	80	23	64	61	73	31

[1] F. Meuser (2)

EINFLUSS VON ENZYMEN AUF INSECTIZIDE

Im Getreide gibt es Enzyme, die so unspezifisch sind, dass sie z. B. als Schädlingsbekämpfungsmittel angewandte Phosphorsäureester abbauen können. Die Umsatzgeschwindigkeit wird ebenso, wie es für Phosphin dargestellt wurde, entscheidend von der Wasseraktivität bestimmt. Von ihr hängt ja nicht nur die Enzymaktivität, sondern auch insbesondere die Penetration ab. Die Penetration und Abbaugeschwindigkeit von Malathion im Keimling und Endosperm von Weizen sind in Abbildung 11 aufgezeigt (10). Bei höherem Wassergehalt dringt der Wirkstoff schnell in die Gewebeschichten ein und wird rasch abgebaut.

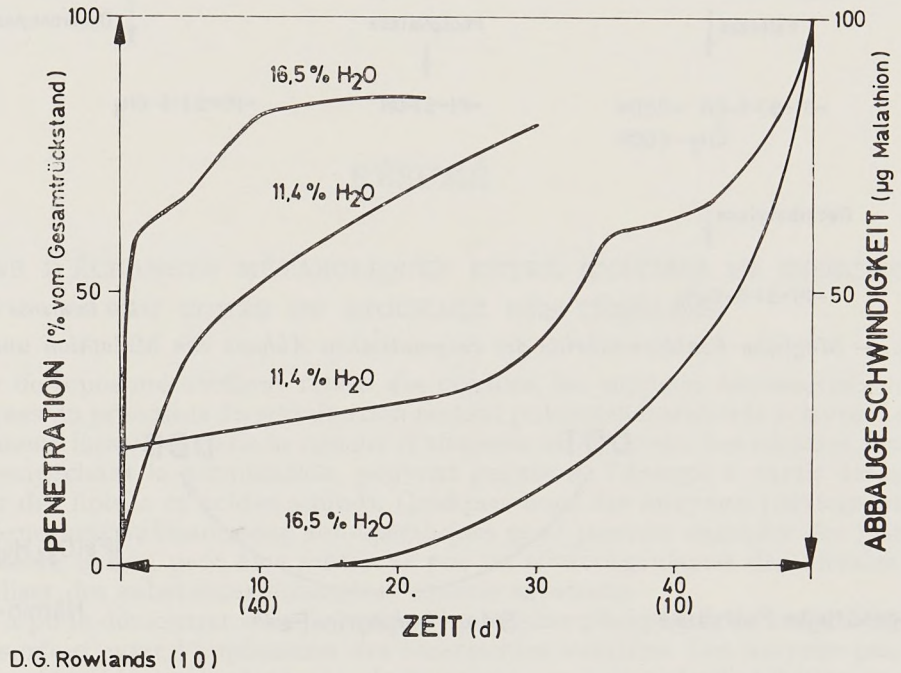


Abb. 11. — *Penetration von Malathion in Keimling und Endosperm von Weizen sowie Abbau des Rückstandes in Abhängigkeit vom Wassergehalt*

Die mögliche enzymatische Degradation von Malathion, das zur Schädlingsbekämpfung im Getreide und Getreidemahlerzeugnissen in grossem Umfange angewandt wird, sowie des verwandten Dimethoats ist in Abbildung 12 dargestellt (10, 16-18). Durch die Wirkung von Amidasen, Phosphatasen und Esterasen entstehen aus dem Wirkstoff jeweils Carboxylderivate, die ihrerseits decarboxyliert werden können.

Dem relativ schnellen Abbau von Phosphorsäureestern im Getreide steht kein gleichartig wirksamer Abbaumechanismus für halogenierte Kohlenwasserstoffe (Lindan, DDT) zur Seite.

Im Getreide erfolgt zwar eine Dehalogenation von Methylbromid ; das Gas methyliert Inhaltsstoffe und bildet dabei anorganische Bromide (19). Einige Schimmelpilze können chlorierte Kohlenwasserstoffe in ihren Stoffwechsel einbeziehen (20). Es ist aber nichts bekannt über die beteiligten Enzyme und ihre natürlichen

Substrate. Der Abbau der chlorierten Kohlenwasserstoffe ist in der Lagerzeit jedenfalls ausserordentlich gering ; darauf beruht die hohe Persistenz dieser Stoffe.

Zum Beispiel wird DDT im Getreide unter aeroben Bedingungen nur in geringem Ausmass zu DDE umgewandelt (21, 22). Da im Verlauf verlängerter Lagerung durch

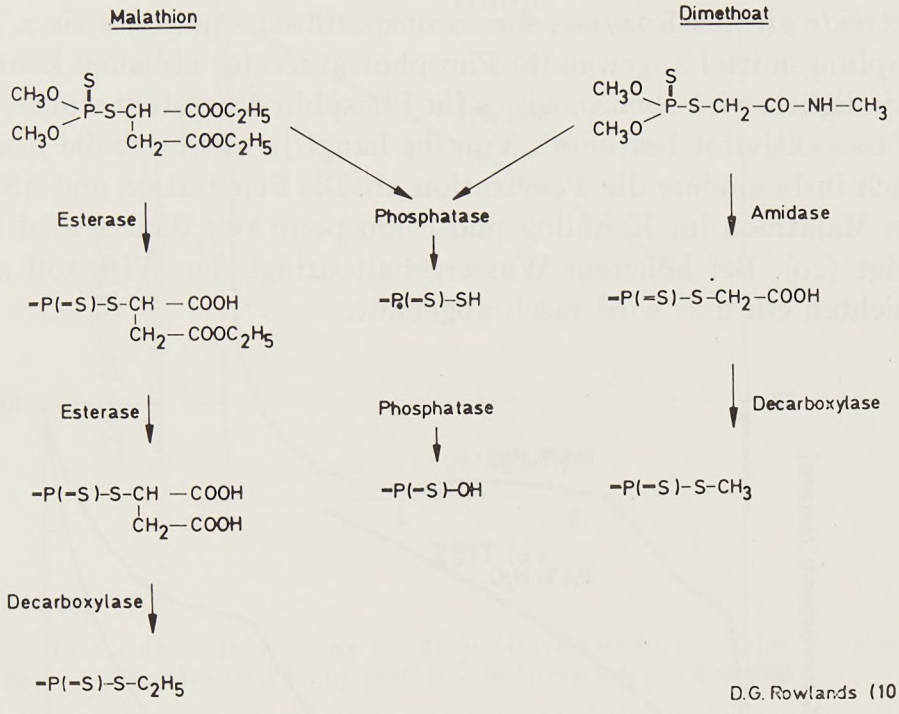


Abb. 12. — *Mögliche Reaktionsschritte des enzymatischen Abbaus von Malathion und Dimethoat*

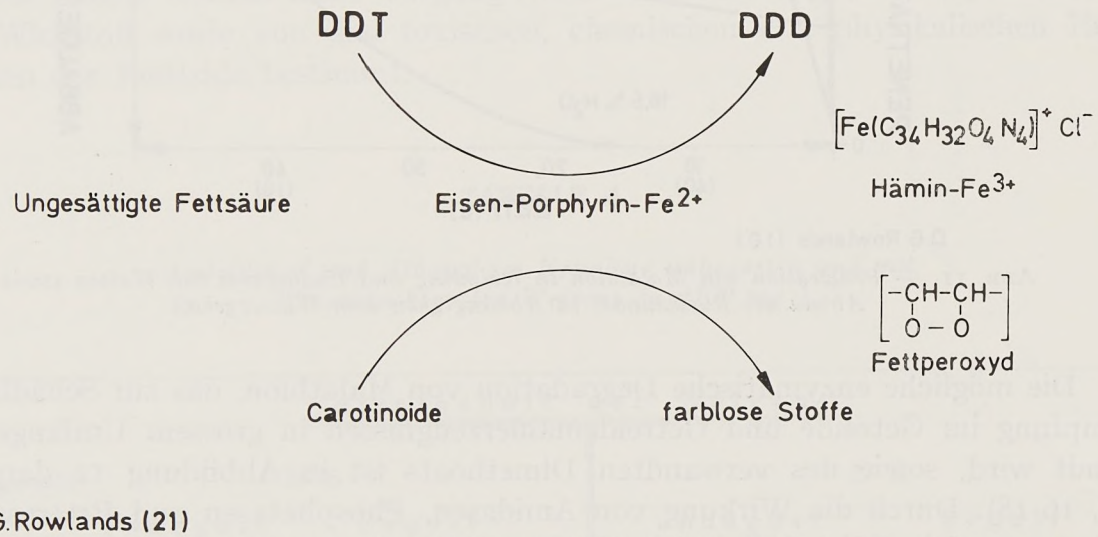


Abb. 13. — *Möglicher reduktiver Abbau des DDT zu DDD im Weizenkeimling unter anaeroben Bedingungen*

die Anhäufung von CO_2 aus den Stoffwechselvorgängen des Getreides eine Anaerobiose entsteht, kann es dann zu einem erhöhten reduktiven Abbau von DDT zu DDD kommen ; er ist wahrscheinlich mit der anaeroben Peroxydation ungesättigter Fette durch Eisen-Porphyrin-Enzyme — Katalase, Cytochrom-C, Peroxydase — verbunden. Die Umsatzgeschwindigkeit wird möglicherweise durch Carotinoide beschleunigt (Abb. 13).

Im Zusammenhang mit dem Abbau von Schädlingsbekämpfungsmitteln ist auch auf die Mikroflora des Getreides hinzuweisen. Die Mikroorganismen haben die Fähigkeit, eine Vielzahl von synthetischen Verbindungen als normale Substrate zu nutzen (10, 23-25).

SCHLUSSFOLGERUNG

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Zustand der relativen Stoffwechselruhe des Getreidekorns bei der Lagerung nur bedingt dazu geeignet ist, Rückstände von Schädlingsbekämpfungsmitteln abzubauen. Deshalb ist es notwendig, bei der Getreideverarbeitung spezifische technische Massnahmen zu ergreifen, um Rückstände von Pestiziden aus den Verarbeitungsprodukten zu beseitigen.

RÉSUMÉ

RÉACTIONS D'ÉCHANGES MÉTABOLIQUES ENTRE ENZYMES ET INSECTICIDES AU COURS DU STOCKAGE DES CÉRÉALES

Dans l'état de repos métabolique relatif des céréales, les enzymes nécessaires pour les réactions métaboliques du processus de germination restent potentiellement très actives. Les enzymes sont essentiellement localisées dans la couche d'aleurone et le germe. Les céréales, stockées dans des conditions empêchant la germination, peuvent gagner de l'énergie à partir des sucres aussi bien qu'à partir des lipides et acides aminés. Quelques-unes des enzymes participant à un processus métabolique sont suffisamment non-spécifiques pour pouvoir dégrader des insecticides et leurs résidus. Cette action peut être renforcée par les microorganismes des céréales qui ont la possibilité d'utiliser des substances étrangères comme substrats.

Comme on a pu le démontrer dans le cas de l'hydrogène phosphoré, un métabolisme minime est nécessaire, surtout pour l'application des insecticides volatiles. Ces moyens peuvent avoir une influence considérable sur la durée de vie du germe, en raison de l'inhibition enzymatique. Par contre, une activité plus élevée de l'eau est désirable pour la dégradation des résidus. Ceci vaut surtout pour la dégradations d'esters de l'acide phosphorique, comme on le décrit dans l'exemple du Malathion. Des hydrocarbures chlorés ne sont pratiquement pas dégradés par la voie du métabolisme des céréales ; c'est là-dessus que repose leur persistance. Le DDT, par exemple ne peut être dégradé que dans des conditions de stockage anaérobies.

SUMMARY

REACTIONS OF METABOLIC EXCHANGES BETWEEN ENZYMES AND INSECTICIDES DURING THE STOCKING OF CEREALS

During comparative metabolic rest of cereals, the enzymes necessary for the metabolic reactions of the germination process remain potentially very active. The enzymes are localized, essentially, in the aleurone layer and the germ. Cereals, stocked in conditions preventing germination, can get energy from sugars as well as lipids and amino acids. Some of the enzymes parti-

cipating in a metabolic process are sufficiently non-specific to be able to degrade insecticides and their residues. This action can be strengthened by the cereals' microorganisms which can use foreign substances as substrates.

As it was possible to demonstrate in the case of phosphine, minimal metabolism is necessary, especially for the application of volatile insecticides. These substances can have a considerable effect on the length of the germ's life by enzymatic inhibition. On the other hand, greater activity of water is desirable for the degradation of residues. This is true especially for the degradation of organophosphorus compounds, as is described in the Malathion example. Chlorinated hydrocarbons are hardly degraded by the process of metabolism of cereals : and their resistance is based on this fact. DDT, for example, can only be degraded in anaerobic conditions.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Kotzé J.-P., Latzko E., 1965. Aktivitätswechsel von Enzymen der Glykolyse sowie des Citrat- und Pentosephosphatcyclus in keimender Sommergerste. *Z. Pflanzenphysiol.*, **53**, 320-333.

(2) Meuser F., 1969. Einfluss der Phosphorwasserstoffbegasung auf Inhaltsstoffe und technologische Eigenschaften des Getreides. *TU Berlin Diss.* D 83, Nr. 259.

(3) Bartels H., 1960. Enzymaktivitäten in ruhenden und keimenden Samen von *Pinus nigra* Ara. *Planta*, **55**, 573-597.

(4) Linko P., Milner M., 1959. Free amino and keto acids of wheat grains and embryos in relation to water content and germination. *Cereal Chem.*, **36**, 280-294.

(5) Rohrlich M., Rasmus R., 1956. Untersuchungen über die Glutaminsäuredecarboxylase im Getreide. I. Papier-chromatographischer Nachweis der Bildung von γ-Aminobuttersäure. *Z. Lebensm.-Unters.*, **104**, 313-316.

(6) Engel Chr., 1947. The distribution of the enzymes in resting cereals. III. The distribution of esterase in wheat, rye and barley. *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 278-279.

(7) Trisvyatskii L. A., 1969. In : *Storage of grain*, vol. I. transl. Keane, D. M., ed. Kent, N. L., Freeman, J. A., Boston : Nat. Lond. Libr. Sci. Techn.

(8) Spiess N. E. L., Sole P. C., Pritzwald-Stegmann B. F., 1969. Wasserdampf-Sorptionsisothermen und spezifische oberfläche einiger wichtiger Lebensmittel. *Dt. Lbsm.-Rdsch.*, **65**, 115-120.

(9) Ebeling W., 1963. Analysis of the basic processes involved in the deposition, degradation, persistence and effectiveness of pesticides. *Residue Reviews*, **3**, 35-163, Berlin : Springer.

(10) Rowlands D. G., 1967. The metabolism of contact insecticides in stored grains. *Residue Reviews*, **17**, 105-177, Berlin : Springer.

(11) Herrmann J., 1970. Zur Kinetik chemischer, enzymatischer und mikrobiologischer Veränderungen bei der Lagerung von Getreide in Abhängigkeit von der Gleichgewichtsfeuchtigkeit. *Kongressber. 5. Welt-Getreide- u. Brotkongr.*, Dresden, Bd. 3, S. 11-15.

(12) Maier-Bode H., 1965. *Pflanzenschutzmittel-Rückstände*, (55-56). Stuttgart : Eugen Ulmer.

(13) Matz S. A., Milner M., 1951. Inhibition of respiration and preservation of damp wheat by means of organic chemicals. *Cereal Chem.*, **28**, 196-207.

(14) Rohrlich M., Meuser F., 1970. Untersuchungen an mit Phosphorwasserstoff begastem Getreide. III. Biochemische Aspekte der Phosphinbegasung. *Getreide u. Mehl*, **20**, 1-16.

(15) Robinson J. R., Bond F. J., 1970. The toxic action of phosphine studies with $^{32}PH_3$; Terminal residues in biological materials. *J. stored Prod. Res.*, **6**, 133-146.

(16) Rowlands D. G., 1970. The metabolic fate of dichlorvos on stored wheat grains. *J. stored Prod. Res.*, **6**, 19-32.

(17) Rowlands D. G., 1965. The *in vitro* and *in vivo* oxidation and hydrolysis of malathion by wheat grain enzymes. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 325-330.

(18) Rowlands D. G., 1966. The *in vitro* and *in vivo* metabolism of dimethoate in stored wheat and sorghum grains. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 90-93.

(19) Winteringham F. P. W., Harrison A., Bridges R. G., Bridges, P. M., 1955. The fate of labelled insecticide residues in food products. II. The nature of methyl bromide residues in fumigated wheat. *J. Sci. Food Agric.*, **6**, 251-261.

(20) Kallman B. J., Andrews A. K., 1963. Reductive dehydrochlorination of DDT to DDD by yeast. *Science*, **141**, 1050.

(21) Rowlands D. G., 1968. The metabolism of DDT in stored wheat grains. *J. stored Prod. Res.*, **4**, 183-196.

(22) Rowlands D. G., 1971. The metabolism of contact insecticides in stored grains. *Residue Reviews*, **34**, 91-161, Berlin : Springer.

(23) Byrde R. J. W., Woodceck D., 1957. Fungal detoxication. II. The metabolism of some phenoxy-n-alkylcarboxylic acids by *Aspergillus niger*. *Biochem. J.*, **65**, 682-686.

(24) Bocks S. M., 1966. The enzymic oxidation of thiols. *Biochem. J.*, 1965-1967.

(25) Ahmed M. K., Casida J. E., 1958. Metabolism of some organo-phosphorus insecticides by micro-organisms. *J. econ. Entomol.*, **51**, 59-63.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 535-543.

UTILISATION DES ENZYMES DANS L'INDUSTRIE DE FRUITS ET LÉGUMES

Wieslaw RZEDOWSKI

Instytut Przemyslu Fermentacyjnego
Rakowiecka 36, Varsovie 12 (Pologne)

RÉSUMÉ

Les préparations enzymatiques pectolytiques sont utilisées dans l'industrie des fruits depuis une quarantaine d'années. Le développement de la science permet de connaître de mieux en mieux les enzymes hydrolysant les composés pectiques, ainsi que leur cinétique et le mécanisme de la réaction. Une connaissance plus exacte des propriétés de ces enzymes et le développement de la technologie de production de jus de fruits a ouvert un vaste champ d'applications pratiques des enzymes pectolytiques. Les exigences qualitatives pour ces préparations enzymatiques évoluent aussi de plus en plus.

Tout d'abord les enzymes pectolytiques étaient utilisées à la clarification des jus de fruits. Leur champ d'application s'étend grâce au traitement enzymatique des pulpes de fruits colorés (groseilles, groseilles à maquereau, framboises). Le traitement facilite le pressurage et augmente le rendement en jus de 5 à 20 p. 100.

Dans la fabrication de jus concentrés (les concentrés) l'application des enzymes pectolytiques pour la dépectinisation des jus devient une nécessité. Au cours des dernières années, par suite de l'utilisation de nouvelles méthodes d'obtention de jus en continu (presses hélicoïdales, à panier, à courroie, filtres à vide), on a jugé utile d'appliquer le traitement enzymatique des pulpes à plusieurs fruits. Cette opération présente les avantages économiques suivants : diminution de la main-d'œuvre, travail en continu, réduction de la durée d'obtention de jus, augmentation du rendement en jus, augmentation de la qualité du jus. A la lumière de ces faits on est conduit à constater que ces méthodes sont appliquées de plus en plus universellement.

L'événement technique le plus marquant au cours de ces dernières années est l'obtention et l'utilisation d'une préparation enzymatique spécifique, contenant uniquement des pectinoglucosidases (Rohament P) dans la fabrication de jus concentrés de légumes. Cette préparation agissant par la macération de tissus, facilite l'obtention de jus de divers légumes, tels que carottes, tomates, choux, céleris. Elle empêche également la formation de sédiments dans les jus non clarifiés.

On observe actuellement une tendance à l'utilisation de préparations bien purifiées, de grande activité enzymatique. Ces propriétés permettent de réduire la durée de réaction et d'effectuer le travail en continu. Les travaux actuels portent sur la fabrication de préparations pectolytiques thermostables ayant un optimum de température situé au voisinage de 60°C. Ces préparations servent au traitement enzymatique des pulpes à chaud.

Toutefois, les préparations utilisées pour la dépectinisation des jus d'orange, originaires de certaines régions, doivent contenir de la naringinase, qui élimine le goût amer.

A côté des préparations pectolytiques, il faut encore citer la possibilité d'utiliser dans l'industrie des fruits d'autres préparations enzymatiques, par exemple la glucose-oxydase, qui exerce une influence avantageuse sur les propriétés organoleptiques des jus de fruits.

INTRODUCTION

Dans les processus technologiques de l'industrie de fruits et de légumes il se produit des réactions enzymatiques non contrôlées — avant tout oxydatives — résultant de la destruction partielle de cellules des fruits et des légumes. Ces réactions exercent une influence défavorable surtout sur la qualité des produits finis. C'est pourquoi on recherche l'inactivation des enzymes, contenues dans les fruits et légumes traités (le blanchiment, la pasteurisation) ou la réduction de leur activité par l'application de basses températures au cours du processus technologique préliminaire particulièrement important.

C'est un paradoxe apparent, que l'industrie dont la première condition dans la technologie normale est la destruction des enzymes depuis plusieurs années utilise les préparations enzymatiques dans ses processus technologiques. Dans ces cas il s'agit des enzymes, dont l'action est avantageuse. Ils facilitent les processus technologiques, augmentent le rendement et dans plusieurs cas améliorent les propriétés organoleptiques. L'utilisation de ces enzymes dans l'industrie de fruits date de plusieurs années. C'est cette industrie, qui la première a commencé l'application des enzymes à l'échelle industrielle.

Actuellement le traitement enzymatique dans quelques cas devient alors une nécessité. Le champ d'application des préparations enzymatiques s'étend constamment, en même temps que les nouveaux produits sont introduits. Dans cet exposé on présente la possibilité d'utilisation de produits enzymatiques dans l'industrie de fruits et de légumes. Nous considérons leur importance technologique, économique ainsi que leur influence sur la qualité. Dans l'industrie on utilise avant tout les enzymes pectolytiques, les enzymes macérantes, les préparations de naringinase et de glucose-oxydase.

UTILISATION DES PRODUITS PECTOLYTIQUES

Les enzymes pectolytiques sont utilisées dans l'industrie des fruits depuis plus de 40 ans. Les recherches fondamentales de Kertesz (1) et Mehlitz (2) sur les pectines et sur les enzymes pectolytiques ainsi que l'obtention de ces enzymes par voie microbiologique, ont permis d'établir les bases de la mise au point de la production des produits pectolytiques d'origine fongique et de développer leur utilisation dans l'industrie des jus de fruits. A partir de ce moment ont commencé les recherches sur la connaissance approfondie des enzymes dégradant les pectines ; leurs caractéristiques, le mécanisme de leur action et la détermination de leur activité, ont permis la mise au point d'une nouvelle technologie de fabrication des enzymes pectolytiques, ainsi que les méthodes de leur utilisation industrielle.

En conséquence de ces travaux grâce à une meilleure connaissance de ce sujet, le champ d'application de ces préparations s'est étendu. Malgré les progrès accomplis, il est difficile de dire que tous les problèmes scientifiques dans ce domaine ont été éclaircis.

Quelques dizaines d'années avant, on ne connaissait que 3 enzymes dégradant les pectines ; actuellement leur nombre a augmenté jusqu'à 11. En outre ces enzymes possèdent d'ordinaire quelques formes *iso*-enzymes. Les *iso*-enzymes diffèrent entre elles par leur optimum de pH, l'optimum de température, l'activité et le niveau de la thermostabilité. L'existence, les propriétés, le mécanisme d'action des enzymes pectolytiques ont fait l'objet de plusieurs conférences scientifiques et de monographies, par exemple : REID (3), NEUKOM (4), SMIRNOW (5), REED (6).

C'est l'endo-polygalacturonase (EPG) et la pectine estérase (PE) qui jouent le rôle le plus important parmi les enzymes connues. Le progrès de la science sur les enzymes pectolytiques a exercé une grande influence sur leur fabrication industrielle. Principalement ce sont les moisissures du genre Aspergillus, qui sont utilisées pour la production de préparations pectolytiques, destinées à l'industrie des fruits. Les premiers produits pectolytiques fabriqués en 1930 n'étaient pas purifiés et leur activité était relativement faible.

Pour l'instant on fabrique des produits purifiés et concentrés en fonction des exigences des acheteurs. L'utilisation d'un produit fini commercial implique une demande d'autorisation des services de la Santé Publique. La production de préparations concentrées a rendu possible la diminution de doses souvent de 20 fois. L'assortiment des produits enzymatiques s'est également multiplié.

En dehors des préparations pectolytiques à température optimale de 40-50°C, on fabrique des préparations thermostables dont la température optimale s'élève jusqu'à 60-65°C. Ce problème était mis au point en Pologne par RZEDOWSKI et OSTASZEWICZ.

Plusieurs usines fabriquent des préparations enzymatiques différentes selon les buts technologiques auxquels elles sont destinées (clarification, dépectinisation de la pulpe de fruits) et selon le genre de fruits pour lesquels ils sont utilisés. Ces produits sont fabriqués sous plusieurs formes : liquide, stable, sur des supports solubles et insolubles avec l'addition de gélatine etc. Les produits provenant de diverses usines diffèrent entre eux à l'égard de la composition des enzymes pectolytiques, leurs propriétés ainsi que la quantité des enzymes supplémentaires ; par exemple : amylases, protéases, cellulases (6, 8). Les raisons de ces différences résident dans les souches et les milieux divers, les différences de technologie d'obtention et de purification. Chacun de ces facteurs exerce une influence sur la composition et les propriétés des enzymes. Par exemple, le changement de type de culture, de fermentation en surface ou en profondeur, influent sur le changement des enzymes pectolytiques et supplémentaires (9).

A l'origine les préparations pectolytiques étaient utilisées pour la clarification des jus. Leur action était plus efficace et plus sûre comparativement aux méthodes physiques et chimiques appliquées jusqu'alors. L'action clarifiante de la préparation consiste en l'hydrolyse des composés pectiques. Ceux-ci sont une des raisons des troubles dans les jus. L'hydrolyse des pectines réduit la viscosité du jus en facilitant le dépôt des produits en suspension. Ces pectines agissent comme des colloïdes protecteurs. Le changement des charges électriques sur les molécules de pectine à cause de l'action de la pectine-estérase présente aussi une grande importance.

Selon les fruits et leur maturité, la température ainsi que la durée nécessaire pour la clarification du jus, les doses des préparations utilisées sont différentes. Primitivement, avec les préparations faiblement purifiées, elles étaient comprises

entre 0,075 et 02 p. 100 par rapport au jus. A présent, on utilise des doses plus faibles qui ne dépassent généralement pas 0,05 p. 100. Les jus de cassis doivent subir la clarification à l'aide de quantités de préparations plus élevées, non seulement à cause de leur teneur plus élevée en pectine, mais encore par suite de la présence de composés polyphénoliques (10). Les polyphénols créent un composé avec la protéine de l'enzyme, et c'est pourquoi ils stoppent l'action enzymatique. C'est la gélatine qui exerce une influence avantageuse sur la vitesse de clarification enzymatique. Les molécules de gélatine chargées positivement, grâce à l'action électrostatique, coagulent avec les molécules de pectine chargées négativement et hydrolysées partiellement. En effet, la clarification du jus est accélérée. Les doses de gélatine utilisées sous forme d'une solution à 1-2 p. 100, sont comprises entre 0,005-0,015 p. 100.

Plus tard, les préparations pectolytiques ont été ajoutées avant pressurage des pulpes de fruits de baies, par exemple : cassis, raisin, framboise, fraise, groseille à maquereau. Cette opération facilitait le processus de pressurage, et augmentait le rendement en jus. Cette méthode a été particulièrement vite acceptée pendant le traitement (l'élaboration) de cassis parce qu'elle facilitait le pressurage, et qu'elle augmentait le rendement en jus et en matières colorantes. Les doses de préparations ajoutées à la pulpe de fruits sont établies selon le genre de fruits et les conditions technologiques (température, durée de l'action de préparation, type de presse).

Elles sont comprises entre 0,05 et 0,2 p. 100 rapportés aux fruits. D'habitude on laisse la pulpe, additionnée de la préparation, reposer dans un récipient pendant quelques heures, puis on effectue le pressurage. L'action avantageuse de la préparation est attribuée à la diminution de la viscosité de pulpe de fruits, ainsi qu'à la dégradation de la paroi de cellule. Il faut constater quand même que le mécanisme d'action des préparations n'est pas encore bien expliqué jusqu'à présent. Plusieurs auteurs attribuent une grande importance dans ce processus aux protéases et aux cellulases, qui existent dans les enzymes supplémentaires, dans les préparations pectolytiques.

La méthode de dépectinisation des pulpes est améliorée par l'utilisation de cette opération à chaud. Le rechauffage de la pulpe jusqu'à la température de 60-80°C, puis l'addition d'une préparation pectolytique thermostable, améliore l'opération de pressurage. Ces facteurs ont augmenté aussi le rendement en jus. Dans ce cas ont peut réduire la durée de l'action des enzymes jusqu'à 1-2 heures et en augmentant les doses jusqu'à 15-30 minutes. Cela permet de travailler en continu. L'utilisation de cette méthode influe sur l'augmentation du rendement en jus, par exemple : Krebs (11) a obtenu 91,4 p. 100 du rendement en jus pendant le pressurage des baies de cassis.

La dépectinisation à chaud améliore aussi la qualité des jus obtenus. Dans ce cas, les enzymes oxydantes sont inactivées partiellement. Les méthodes de dépectinisation de la pulpe ont permis d'augmenter le rendement en jus au pressurage. Les données quantitatives des essais technologiques présentés dans les divers travaux sont assez variables, comprises entre 5 et 20 p. 100.

L'augmentation du rendement dépend du genre de fruits, de leur maturité, des méthodes utilisées ainsi que du type de presses et de leur état technique. En Pologne dans l'industrie de fruits on utilise la dépectinisation de la pulpe de cassis, de prunes, fraises et ronces. Celle-ci a augmenté le rendement en jus de 5-10 p. 100

et amélioré le travail de l'unité de pressurage. L'intérêt économique de la dépectinisation des pulpes dépend des prix actuels des fruits et des préparations pectolytiques dans les différents pays. D'après l'auteur, c'est le quotient de valeur de jus obtenu supplémentairement et de la valeur de la préparation pectolytique appliquée, qui présente le meilleur indice. Dans les conditions polonaises cet indice dépasse 3 c'est-à-dire qu'il est bien avantageux.

L'autre orientation de l'utilisation des préparations pectolytiques est relative à la dépectinisation de jus, destiné à la production de jus concentrés. L'utilisation des préparations pectolytiques dans la fabrication de produits concentrés (par concentration sous vide) devient une nécessité. Pendant que la clarification de jus peut être effectuée par d'autres méthodes — l'obtention de produit concentré n'est pas possible sans une dépectinisation préliminaire complète. L'utilisation des préparations pectolytiques dans les cas mentionnés ci-dessus est devenue courante en pratique industrielle. On estime, que dans plusieurs pays d'Europe près de 40 p. 100 de jus fabriqués sont traités par les préparations pectolytiques. Au cours des dernières années on aperçoit une tendance à l'utilisation de la dépectinisation enzymatique de la pulpe de pomme. Les travaux sur ce sujet, par exemple de Pilnik (12,13), démontrent l'opportunité de cette opération. Actuellement on a mis en pratique et au point de nouvelles méthodes et des appareils destinés à l'obtention de jus. Avant tout il s'agit d'appareils automatiques, qui travaillent en continu. C'est Moneret (14), qui présente l'évolution dans la technologie de jus. Dupaigne (15) a présenté une revue très complète des appareils utilisés dans ce cas en continu. Le travail régulier de certains appareils, par exemple des filtres à vide, exige la dépectinisation enzymatique des pulpes. Les avantages de ce traitement sont les suivants :

— possibilité d'augmentation du rendement et diminution de la durée d'obtention du jus ;
— possibilité d'automatisation des processus technologique qui est liée avec la diminution de la main-d'œuvre (particulièrement les travailleurs saisonniers).

Ces avantages permettent de supposer que les nouvelles méthodes dominent dans la pratique industrielle. En Pologne les études sur ce sujet, réalisées par Kwasniewski signalent des résultats positifs. Pendant les travaux sur les enzymes pectolytiques on se heurte à des difficultés : c'est surtout le manque de méthodes objectives d'appréciation sur leur activité et leur utilité. Aucune méthode utilisée jusqu'à présent ne peut être considérée comme une méthode idéale. D'habitude leurs principes sont basés sur la mesure de la diminution de la viscosité d'une solution de pectine ou de jus de pomme additionné de pectine. Une baisse de viscosité donnée en p. 100 constitue une base pour exprimer l'activité en unités (16,17). Toutefois les préparations commerciales de pectine possèdent des propriétés différentes de celles de la pectine demeurant dans les fruits. Ces préparations varient entre elles par le poids moléculaire ainsi que par le degré d'estérification. Le poids moléculaire de la pectine d'après Bock (18) et le degré d'estérification d'après Ostaszewicz (19) influent sur les résultats du dosage de l'activité pectolytique. La recherche des méthodes de dosage d'activité pectolytique plus objective est une question bien urgente.

UTILISATION DES ENZYMES MACÉRANTES

Au cours des années dernières on a introduit dans la pratique industrielle les enzymes macérantes. Dans ce cas il s'agit de la désintégration des substances végétales — la dégradation des lamelles mitoyennes qui collent les cellules séparées des fruits et des légumes.

Les préparations de ce genre contiennent une endopolygalacturonase (EPG) et de la pectine-estérase (PKG) en traces (8,20). On propose l'utilisation de ces préparations pour la fabrication des nectars et des jus de fruits non clarifiés et avant tout pour la production des jus de tomates et légumes (carottes, céleris), troubles, sans sédiments, ainsi que pour leurs concentrations. On recommande aussi l'application des enzymes macérantes dans la production de produits nutritifs à partir de fruits et légumes destinés aux enfants (Baby Food).

Jusqu'à présent, il n'y a pas eu beaucoup de travaux sur la composition enzymatique de ce type de préparations, le mécanisme et la cinétique d'action d'enzymes. Les essais technologiques sur leur mise en pratique ainsi que l'effet de leur action ne sont pas non plus nombreux. On entrevoit, cependant, que les préparations macérantes auront prochainement un rôle dominant dans la technologie industrielle des fruits et légumes.

UTILISATION D'AUTRES ENZYMES

A. — *Naringinase*

Le goût amer de quelques sortes d'oranges et de pamplemousses dépend d'une manière significative de la présence de la naringine (6). Pour éliminer cette amertume, surtout dans le cas des oranges originaires d'Asie et d'Australie, on utilise une préparation de naringinase. Dans la composition de cette préparation on distingue deux glucosidases, qui agissent de la façon suivante :

$$\text{naringine} \xrightarrow{\text{ramnosydase}} \text{prunine} + \text{rhamnose} \xrightarrow{\text{bêta glucosidase}} \text{naringinine} + \text{rhamnose} + \text{glucose}$$

La naringinine résultant de l'action des enzymes n'est pas amère. C'est au Japon et en Australie que les préparations de naringinase inspirent un intérêt particulier.

B. — *Glucose-oxydase*

La préparation de glucose-oxydase est recommandée pour conserver la couleur et les caractères organoleptiques des jus de divers produits de fruits et légumes. L'action de glucose-oxydase vise à l'élimination de l'oxygène des produits et bouteilles. Kaufmann et Campbell (21) ont constaté que le jus d'orange additionné

de glucose-oxydase ne subit pas de brunissement durant le stockage et conserve un goût et un arôme typique. BARTON (22) a fixé que la glucose-oxydase stoppe la décoloration de quelques jus, préserve des changements nuisibles de goût et d'arôme en même temps qu'elle diminue la pénétration du fer dans les jus en boîte. Pendant 6 mois de stockage le jus d'orange gazeux a conservé une couleur fraîche, son goût et son arôme typique. Plusieurs travaux montrent aussi une influence positive et stabilisante de la gluco-oxydase sur l'acide ascorbique dans de nombreux produits à base de fruits et de légumes. En U. R. S. S. (23) on a constaté, que la glucose-oxydase et l'acide sorbique stabilisent les jus de fruits sans avoir recours à la pasteurisation. Les jus stabilisés de cette façon présentent une bonne qualité organoleptique et n'ont pas subi de pertes en acide ascorbique.

C. — *Tannase et anthocyanases*

C'est au Japon où l'on a mis au point les méthodes d'obtention de tannase (24, 25). C'est une enzyme qui hydrolyse le tannin et les pigments anthocyaniques. Leur utilisation est recommandée pour les jus trop riches en matières tannantes et pigments anthocyaniques et présentent pour cette raison un goût trop amer et âpre. On peut adoucir cette propriété organoleptique par hydrolyse partielle des composés cités ci-dessus.

CONCLUSIONS

Cette rapide revue des utilisations les plus importantes des enzymes montre leur rôle croissant dans l'industrie des fruits et légumes. Il apparaît que cette technique se développera de plus en plus en portant avec elle des avantages importants tant pour les producteurs que pour les consommateurs en permettant l'obtention de produits stables et de bonne qualité.

Le développement des études sur les enzymes permet de penser que les préparations enzymatiques nouvelles seront mises en pratique, en premier lieu dans les procédés en continu. On étudie la possibilité d'utilisation des enzymes « aromatiques », grâce auxquelles on obtiendra des produits présentant des caractères organoleptiques plus avantageux. Sans doute au cours des années prochaines on produira des préparations enzymatiques nouvelles ainsi qu'on mettra au point les méthodes nouvelles de leurs utilisations. Les préparations enzymatiques nouvelles mises en pratique donneront de bons produits délicieux et de haute valeur nutritive.

SUMMARY

USE OF ENZYMS IN FRUIT AND VEGETABLE INDUSTRIES

The enzymatic, pectolytic preparations has been used in the fruit industries since about forty years. The evolution of the science allows to know better and better the enzyms, which hydrolyse the pectic. compounds, their kinetic and the mechanism of process. A more exactly

knowledge of the enzyms properties and the development of the technology of production of fruit juices has opened a large view of pratic applications of pectolytic enzyms. The qualitative requirements for these enzymatic preparations are developing also more and more.

First, the pectolytic enzyms were used for the clearing of fruit juices. Their field of application is stretching, than of enzymatic treatment to the pulps of colored fruits (currants-gooseberries raspberries). This treatment facilitates the pressing and increases the juice output of 5 to 20 p. 100.

In the production of concentrated juices the application of pectolytic enzyms for the juices depectinisation becomes necessity. During the last years, because of the use of new continued methods of producing of juices (helicoïdal press, vacuum-filtres), it has been judged useful to apply the enzymatic treatment of the pulps to several fruits. This process presents the following economic advantages : diminution of man-power, continued working, reduction of the time of producing juices, increase of the juice output and of its quality.

On these accounts we are ascertaining that these methods are applied more and more universally.

The most important technological event during these last years are the producing and the use of a specific enzymatic preparation which only contains pectino-glucosidases (Rohament P) in the fabrication of concentrated vegetable juices. This preparation which has an effect on the maceration of the tissues, facilitates the obtainment of juices of different vegetables, so as carrots, tomatoes, cabbage, celery. It prevents also the formation of disposits in the non-clarified juices.

We actually observe a tendency to use well purified preparations which possess a great enzymatic activity. These properties allow to reduce the time of reaction and the continual processing. The actual studies concern the production of pectolytic thermostable preparations which have an optimum of temperature nearly situated at 60°C. These preparations are used to the hot enzymatic treatment of the pulps.

However, the preparations used to the depectinisation of the orange juices from certain countries must contain the naringinase, which eliminates the bitter taste.

Besides these pectolytic preparations we also indicate the possibility to use in the fruit industry other enzymatic preparations, for example the glucose-oxydase which has a favourable influency on the organoleptic properties of the fruit juices.

ZUSAMMENFASSUNG

ENZYMANWENDUNG IN DER OBST- UND GEMÜSEINDUSTRIE

Seit 40 Jahren schon werden pektolytische Enzyme in der Obstindustrie angewandt. Mit der Entwicklung der Wissenschaften erweitern sich unsere — die Pektinverbindungen hydrolisierende Enzyme betreffenden Kenntnisse immer mehr. Dieses betrifft vor allem ihre Kinetik und den Wirkungsmechanismus. Die bessere Kenntnis der Eigenschaften pektolytischer Enzyme, sowie der Fortschritt der Technologie der Obstsaftproduktion, erweitern die Möglichkeiten ihrer praktischen Anwendung und ändern die der Qualität dieser Präparate gestellten Anforderungen.

Anfänglich wurden pektolytische Präparate nur zur Klärung von Obstsäften angewandt. Ihr Anwendungsbereich erweiterte sich dann jedoch im Zusammenhang mit der Einführung der sogenannten « Maischefermentierung » der Beeren (z.B. Johannisbeeren, Stachelbeeren,Himmbeeren usw.), eines Prozesses, welcher die Saftausbeute um 5 bis 20 p. 100 steigerte.

Die Anwendung pektolytischer Präparate während der Herstellung konzentrierter Obstsäfte — zu ihrer Depektinisierung ist zu einer unentbehrlichen technologischen Massnahme geworden. In Zusammenhang mit der in den letzten Jahren auftretenden Tendenz der Anwendung neuzeitlicher, kontinuierlicher Methoden zur Safterhaltung (Schneckenpressen, Strangpressen, Korbpressen und Vacuumfilter), ist die enzymatische Bearbeitung der Maische aller Obstsorten zweckmässig. Die mit der Anwendung dieser Methode verbundenen Vorteile, wie zum Beispiel das Vermindern der Arbeitskosten, kontinuierliche Arbeitmethoden, das Verkürzen der Presszeit, die Steigerung der Ausbeute und Qualität der erhaltenen Säfte weisen darauf hin, dass diese Enzyme in kürze eine allgemeine Anwendung finden werden.

Die neueste Errungenschaft der letzten Jahre besteht in der Anwendung eines spezyfischen, pektolytischen Präparates, welches ausschliesslich Pektinglukosidasen enthält. Dieses Präparat, z. B. « Rohament P », wird vor allem zur Herstellung von Gemüsesäften und Konzentraten angewandt. Durch die Mazeration des Gewebes erleichtert es die Saftproduktion zum Beispiel aus Karotten, Tomaten, Selerie, Kohl usw. und verhindert das Entstehen von Sätzen in natürlich trüben Säften. Die Entwicklungstendenz der Industrie geht in der Richtung der Anwendung

immer besser gereinigter, höchst aktiver Präparate. Die Anwendung solcher Präparate ermöglicht ein Verkürzen ihrer Wirkungszeit, sowie die Anwendung kontinuierlicher Arbeitsmethoden. Grosse Aufmerksamkeit wird auch der Erhaltung thermostabiler, pektolytischer Präparate — mit einem Temperatur optimum von 60°C zugewandt, deren Anwendung eine « Wärme fermentierung » ermöglicht.

Die zur Depektiniesierung von Orangensäften in einigen Regionen angewandten Präparate müssen ausser den pektolytischen Enzymen auch noch die Naringinase enthalten.

Ausser pektolytischen Präparaten, können in der Obst- und Gemüseindustrie auch andere, wie z. B. Glukosooxydase angewandt werden, welche die organoleptischen Eigenschaften des erhaltenen Saftes günstig beeinflussen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Kertesz Z. I., 1936. *Ergebn. Enzymforsch.*, **5**, 233.

(2) Mehlitz A., 1934. *Biochem. Zeitschr.*, 268, 355.

(3) Reid W. W., 1963. Proizwodstwo i primienienie fermentnych prepraratov w piszczewoj promyszlennosti/traduit de l'anglais/*Piszczepromizdat, Moskwa*, 35.

(4) Neukom H., 1969. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft.* Supplementum 8. Dr. D. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 91.

(5) Smirnow W. I., Kotjelew W.-W., 1971. *Pektoliticzeskije fermenty mikroorganizmow.* Akademia Naulk Moldawskoj S. S. R. Kiszyniew.

(6) Reed G., 1966. *Enzymes in Food Processing.* Academic Press. New York, London.

(7) Rzedowski W., Ostaszewicz D., 1966. *VI Wissenschaftliche Tagung der Lebensmittelindustrie* 19-21-5. Budapest, Ungarn.

(8) Rombouts F. M., Pilnik W., 1971. *Flüssiges Obst.*, **38**, 3, 93.

(9) Rzedowski W., Ostaszewicz D., 1968-69. II Internationales symposium der Gärungsindustrie. Leipzig. *Symposiumsberichte*, 3, 461.

(10) Wucherpfennig K., Millies K. D., Landgraf H., 1970. *Flüssiges Obst.*, **37**, 3, 87.

(11) Krebs J., 1955. *Flüssiges Obst.*, **22**, 6, 6.

(12) Pilnik W., de Vos L., 1970. *Flüssiges Obst*, **37**, 10, 430.

(13) Verspuy A., Pilnik W., 1970. *Flüssiges Obst*, **37**, 12, 518.

(14) Moneret Y., 1970. *Ind. alim. agric.*, **87**, 5, 511.

(15) Dupaigne P., 1971. *Revue de la Conserve*, **28**, 12, 89.

(16) Kyzlink V., 1950. O ucvinnosti filtravcnich enzymu prvi pektolyse ovocnych svtav. *Prum. Vyd. Praha.*

(17) Société Rapidase. Viscosimetric determination of liquefying power of pectinase on a pectin : P. P. V. Units.

(18) Bock W., Dongowrki G., Krause M., Nahrung/im Druck.

(19) Ostaszewicz D., Rzedowski W., 1972. *Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoz.*, 22 (sous presse).

(20) Grampp E., 1969. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **65**, 11, 343,

(21) Kaufmann C. W., Campbell K.-A., 1949. *Food Technology*, **3**, 395.

(22) Barton R. R. *et al.*, 1955. *Food Eng.*, **27**, 12, 70.

(23) Grebszowa R. N., 1969. *Die Lebensmittelindustrie*, **16**, 4, 123.

(24) Osao A. *et al.*, 1968. *Agric. and Biol. Chem.*, **37**, 9, 1079.

(25) Hisaitiwo F. *et al* : *Pat. Japonski kl. 36 bonr 7727, opubl.*, **22**, 04-66..

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 545-553.

LES PECTINETRANSÉLIMINASES ET LEURS POSSIBILITÉS D'APPLICATION EN TECHNOLOGIE DES JUS DE FRUITS

D. REYMOND et D.A. BUSH

Laboratoire de Recherches,
Société d'Assistance Technique pour Produits Nestlé,
Case Postale 1009, Lausanne - 1001 (Suisse)
Directeur : Prof. L. Rey

RÉSUMÉ

Les enzymes pectolytiques sont utilisées en technologie des jus de fruits pour dégrader les pectines et rompre leur association avec d'autres constituants. Les préparations commerciales contiennent en général plusieurs types d'enzymes :

— pectine méthylestérases qui hydrolysent la pectine en méthanol et pectate ;
— polygalacturonases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques α — (1 → 4) des pectates en donnant de l'acide galacturonique ou des oligouronides solubles ;
— polyméthylgalacturonases qui hydrolysent des liaisons glycosidiques dans les pectines sans intervention préalable de pectineméthylestérases.

Nous avons étudié un autre type d'enzyme, une pectine transéliminase d'origine fongique. Cette enzyme provoque la rupture au hasard des liaisons glycosidiques α — (1 → 4) de la pectine en donnant des fragments présentant une double liaison sur le carbone 4 du cycle pyranique de l'acide D-galacturonique final. L'utilisation de cette enzyme présente l'avantage de libérer peu de méthanol à partir de pectines si on compare son action à celle de pectineméthylestérases et polygalacturonases associées.

L'application de ce type d'enzymes a donné des résultats intéressants en technologie des jus d'oranges.

INTRODUCTION

Les enzymes pectolytiques d'origine fongique peuvent être utilisées en technologie des jus de fruits pour faciliter les opérations d'extraction ou de clarification. Il convient de remarquer que leur utilisation dépend naturellement des exigences de la législation en vigueur dans le pays d'utilisation. Nous nous écarterons de cet aspect pour ne considérer que l'aspect technologique de base de ces applications.

Les préparations commerciales contiennent en général plusieurs types d'enzymes. La classification proposée par DEMAIN et PHAFF (1) sera utilisée. Selon ces auteurs, on distingue entre :

— pectine-méthylestérases, enzymes hydrolysant la fonction ester méthylique de la pectine pour donner de l'acide polygalacturonique et de l'alcool méthylique.

— polygalacturonases, enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques $\alpha(1 \rightarrow 4)$ des pectates en donnant de l'acide galacturonique ou des oligouronides solubles. Ces enzymes sont classées en deux catégories : les *endo*-polygalacturonases qui provoquent un rapide abaissement de la viscosité des solutions pectiques et les *exo*-polygalacturonases qui assurent la dégradation complète de la chaîne polygalacturonique jusqu'au maillon élémentaire constitué par l'acide galacturonique.

— polyméthylgalacturonases, enzymes qui agiraient directement sur la pectine en provoquant elles aussi la rupture des liaisons glycosidiques $\alpha(1 \rightarrow 4)$.

Ces enzymes existent dans les cellules des végétaux supérieurs. Elles peuvent être activées suivant l'environnement ionique. On a relevé la présence de nombreux inhibiteurs naturels qui régulent l'activité enzymatique. Dans les fruits, ces enzymes sont activées lors de la maturation et nous avions montré en 1961 que la maturation de l'avocado est accompagnée par le développement d'activité de polygalacturonases (REYMOND et PHAFF (2)). Les enzymes d'origine industrielle sont obtenues par génération extracellulaire à partir de diverses espèces fongiques. Les pectineméthylestérases d'origine fongique présentent un pH optimum d'action vers 5,0 qui rend très intéressante leur utilisation industrielle pour la clarification des jus de fruits. Il convient de remarquer cependant que cette dégradation est accompagnée par la génération dans le milieu de traces d'alcool méthylique. On utilise donc, en général, un mélange de pectineméthylestérases et d'endopolygalacturonases. ENDO de 1963 à 1965 (3) a extrait à partir d'un jus de fermentation de *Coniothyrium diplodiella* 5 enzymes différentes soit : 3 *endo*-polygalacturonases, une *exo*-polygalacturonase et 2 pectineméthylestérases. Chacune des enzymes isolées n'a pas d'effet sur la clarification, tandis que le mélange d'une pectineméthylestérase avec une *endo*-polygalacturonase provoque la clarification. Une excellente mise au point sur l'utilisation d'enzymes pectolytique en technologie des jus de fruits a été présentée par MARTEAU (4) au cours de journées scientifiques en 1967 qui avaient été mises sur pied par le Centre national français de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation.

Nous nous permettrons de résumer ici à titre d'introduction les données de cette publication qui concernent les critères d'efficacité des préparations commerciales. Puisque le mélange d'une pectineméthylestérase avec une *endo*-polygalacturonase est nécessaire pour obtenir une action sur les pectines natives des jus de fruits, MARTEAU et ses collaborateurs ont déterminé l'efficacité des préparations. Ils ont trouvé que l'efficacité dépend directement de l'activité de la partie pectineméthylestérase comme le montre le tableau de variations d'activité en fonction du pH.

On constate en effet que la libération des fonctions réductrices, soit l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, est beaucoup plus prononcée pour l'acide polygalacturonique que pour la pectine et que l'activité de la pectineméthylestérase est donc déterminante dans l'efficacité de la réaction.

Dans le test d'extraction du jus au cours de la macération du raisin, MARTEAU a aussi démontré que le rendement en jus est accompagné par la génération de méthanol comme le montre le tableau tiré de la même publication.

TABLEAU I

Action d'une préparation commerciale de pectinase

pH	Groupements réducteurs libérés en méq./mg de préparation/h		Méthanol libéré méq./mg de préparation/h
	Acide pectique	Pectine	Pectine
2,6	0,284	0,065	0,060
3,0	0,84	0,090	0,080
4,0	1,84	0,13	0,13
5,0	0,44	0,085	0,13
6,0	traces	0,04	0,022

MARTEAU 1968.

TABLEAU 2

Taux de méthanol et rendement en jus

	Taux limite de méthanol	Gain de rendement en jus en p. 100 par rapport au témoin
Jus de raisin immédiatement séparé	25	0
Macération de 6 jours sans addition d'enzyme pectolytique	55	+ 11
Macération de 24 h en présence d'une préparation enzymatique commerciale	123	+ 25

MARTEAU 1968.

Mais revenons à la classification des enzymes pectolytiques. En 1960, ALBERSHEIM, NEUKOM et DEUEL (5) mettent en évidence un nouveau type d'enzyme. Ils isolent en effet à partir d'une pectinase commerciale une enzyme qui provoque la dégradation de la pectine en donnant des métabolites présentant une absorption

intense dans l'ultraviolet à 235 nm. Cette absorption est due à la présence d'une double liaison entre les carbones 4 et 5 de certaines unités d'acide galacturonique. La classification des enzymes pectolytiques devait donc être complétée et sans vouloir allonger ici cet exposé, nous utiliserons la classification récente proposée par BATEMAN et MILLAR (6).

Elle distingue deux groupes d'actions enzymatiques, soit la rupture de liaisons $\alpha(1 \rightarrow 4)$ par hydrolyse et la rupture par transélimination conduisant à la formation de doubles liaisons entre les carbones 4 et 5 de certaines unités d'acide galacturonique. La classification proposée par DEMAIN et PHAFF est ainsi étendue pour englober le nouveau type d'enzymes.

On distinguera en particulier :

Les transéliminases qui provoquent une rupture au hasard des liaisons glycosidiques sont appelées *endo*-pectine-transéliminases ou *endo*-polygalacturonate-transéliminases suivant qu'elles attaquent les pectines ou les acides polygalacturoniques. On distingue aussi deux classes d'*exo*-transéliminases lorsque ces enzymes agissent sur le chaînon terminal de la chaîne des deux polysaccharides. Depuis leurs découvertes, les transéliminases ont été identifiées dans les jus de culture de plusieurs microorganismes appartenant aux genres *Erwinea, Clostridium, Pseudomonas, Aspergillus, Penicillium.*

Il existe enfin un quatrième groupe d'enzymes qui sont capables de dégrader les arabanes et les galactanes, polysaccharides qui sont généralement associés aux pectines dans les tissus végétaux.

RÉSULTATS DE NOS TRAVAUX SUR LA PECTINE-TRANSÉLIMINASE

Dans notre laboratoire, le Dr David Anthony BUSH (7) a étudié plus particulièrement une pectine transéliminase qui est générée dans le milieu de culture par une souche de champignon microscopique filamenteux. Nous désirons donner dans cette communication quelques indications sur le mode d'action de cette enzyme et sur l'intérêt potentiel de cette préparation pour des applications technologiques. Quelques kg de cette enzyme ont été produits dans notre installation pilote placée sous la direction experte de M. Knut TRAELNES. L'intérêt réside dans le fait que cette enzyme peut être générée lorsqu'on cultive le microorganisme en milieu liquide, ce qui rend l'opération d'isolement beaucoup plus facile. Après séparation du mycélium, le milieu de culture est concentré et stabilisé par lyophilisation.

Les essais préliminaires ont montré que la préparation enzymatique est active sur la pectine d'agrume Fluka. Des méthodes pour déterminer l'activité enzymatique ont été mises au point.

Une unité d'activité est définie par la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une réduction de 1 p. 100 de viscosité lorsqu'on utilise la méthode proposée par ROBOZ *et al* (8) en opérant sur un viscosimètre capillaire de la manière suivante :

Dans un viscosimètre d'Ostwald capillaire d'une contenance de 3 ml, mélanger 3 ml d'une solution à 0,5 p. 100 de pectine (tampon citrate) avec 0,3 ml de solu-

tion d'enzyme et observer la réduction de viscosité produite à une température de 30°C.

Si V_o = durée d'écoulement du substrat + solution d'enzyme inactivée par chaleur.
V_t = durée d'écoulement du substrat + solution d'enzyme active
V_s = durée d'écoulement du tampon + solution d'enzyme inactivée

Réduction de viscosité en p. 100 : $V_o - V_t / V_o - V_s \times 100$.

Pour suivre la réaction de dégradation, il est plus commode d'utiliser un viscosimètre rotatif de type Haake, à partir des données duquel on peut aussi calculer l'activité de la préparation enzymatique. Le Dr Bush a aussi appliqué une méthode spectrophotométrique modifiée d'après les données originales de Albersheim et Killias (9). Il est possible de réaliser la dégradation enzymatique directement dans une cuvette de quartz et de suivre l'augmentation d'absorption à 235 nm provoquée par l'hydrolyse. Les expériences préliminaires sur un jus de culture en flacons secoués ont montré que les activités étaient comparables à celles d'enzymes commerciales comme le montre le tableau 3.

TABLEAU 3

Activités mesurées au viscosimètre capillaire

	Unités de réduction viscosimétrique sur			
	Pectine pH 5,2	Pectine pH 3,5	Jus d'orange pH 3,5	Jus de pomme pH 3,8
Jus de culture	5,3	1,4	4,6	1,4
Jus de culture concentré 3 fois	15,4	3,9	12,2	3,7
Pectinases commerciales				
A à 1 %	1,5	2,7	2,6	0,3
B à 1 %	2,3	3,6	2,9	0,4
C à 1 %			2,2	1,1
D dilué au 1/10			2,0	0,3

On constate une grande différence d'activité de la préparation enzymatique à pH 3,5 si l'on compare l'action sur la pectine d'agrume et l'action sur le jus d'orange. Ce fait n'a pas encore trouvé une explication scientifique. Divers essais d'optimisation du milieu ont permis au Dr Bush d'augmenter le rendement du jus de culture en unités d'enzyme active. Les essais ont été repris en utilisant le viscosimètre rotatif de Haake qui offre une détermination plus précise de la réaction.

L'examen des courbes montre que l'interprétation d'activité est assez difficile. M. Bush a donc fait d'autres mesures dans lesquelles un jus d'orange à pH 4,0 était soumis à l'action des diverses préparations enzymatiques jusqu'à ce que sa viscosité ait baissé de 6,5 à 1,6 centipoises.

TABLEAU 4

Activités mesurées au viscosimètre rotatif de Haake

	Unités de réduction viscosimétrique sur le jus d'orange
Jus de culture dilué au 1/10	4,6
Préparations commerciales	
A à 0,1 p. 100	1,7
B à 0,1 p. 100	3,0
C à 0,1 p. 100	2,0
D dilué au 1/100	0,9
E à 0,1 p. 100	3,0
F à 0,1 p. 100	1,0

TABLEAU 5

Abaissement de viscosité du jus d'orange à 1,6 centipoises

	Durée nécessaire pour cet abaissement en minute
Jus de culture non dilué	10,6
Préparations commerciales	
A à 1 p. 100	46,8
B à 1 p. 100	Viscosité limite à 2,0 cps
C à 1 p. 100	— — 2,3 cps
D à 1/10 dilution	23,4
E à 1 p. 100	14,8
F à 1 p. 100	Viscosité limite à 5,0 cps

Nous avions montré au début de cet exposé que la plupart des préparations enzymatiques actuellement sur le marché contiennent un mélange de pectinéméthylestérases et de *endo*-polygalacturonases. Il était donc logique de doser le méthanol libéré par les préparations commerciales et par la préparation de transéliminase. L'incubation des enzymes avec la pectine a été réalisée à pH 5,0 pendant 15 heures à 25°. Le Dr Bush a trouvé les résultats suivants (tabl. 6.)

On voit donc que les préparations commerciales D et E provoquent la libération d'une quantité appréciable de méthanol originalement lié sous forme d'ester méthylique sur la pectine. La préparation enzymatique contenant la transéliminase ne libère que les 40 p. 100 du méthanol total. Cette propriété présente un intérêt certain dans la technologie des jus de fruits. Rappelons ici le travail de Bouscharain et Boivin (10) qui relate des teneurs en méthanol de jus de fruits.

La pectinetranséliminase a pu être produite à l'échelon pilote. Une activité de 65 unités a été trouvée alors que la culture en flacons secoués avait donné au plus 45 unités pour le jus de culture après filtration du mycélium. Il semble donc que cette enzyme pourrait être produite sur grande échelle si son application en technologie des jus de fruits présente de l'intérêt.

MM. Bush et Traelnes ont produit une poudre enzymatique qui présente environ 4 000 unités de réduction viscosimétrique par gramme.

TABLEAU 6

Quantités de méthanol libérées au cours de l'hydrolyse de la pectine

	En p. 100 de la pectine	En p. 100 du méthanol libéré par action de NaOH
NaOH 0,1 N	5,7	100
Pectinase commerciale D ..	5,3	93
Pectinase commerciale E...	4,6	81
Jus de culture	2,4	42
Préparations enzymatiques inactivées par chaleur ...	0	0

TABLEAU 7

Teneurs en méthanol de divers jus de fruits en mg/litre

Raisin	9-18	Abricot	75-122
Ananas	14-21	Prune	215
Orange	12-34	Cassis	640
Poire	20	Sureau	250
Pamplemousse	14-55		
Pomme	12-55		

TABLEAU 8

Inactivation thermique par chauffage pendant 5 minutes à la température indiquée	Réduction de l'activité en p. 100
50	2
55	3
60	39
65	96
70	100
75	100

Le pH optimum d'action de la pectinetranséliminase est de 5,2. Ce pH relativement élevé ne permet pas l'application de cette enzyme en clarification de jus de fruits très acides comme le sont les cassis par exemple. Il convient de remarquer cependant que les pectineméthylestérases d'origine fongique présentent elles aussi un pH optimum d'activité vers 5 ; ces préparations sont cependant actives aux pH plus acides des jus de fruits.

La préparation de pectinetranséliminase présente une activité utilisable entre 15 et 55°C, comme le montre le tableau caractérisant l'inactivation thermique.

Des essais de toxicité aiguë de la pectinetranséliminase ont montré qu'à la limite de solubilité la préparation était sans effet toxique sur la souris par voie orale et par voie intrapéritonéale. Ces essais ont été réalisés par le Dr H. P. Wuerzner. Une recherche microbiologique sur la présence éventuelle de composés bactériostatiques dans le jus de culture a démontré l'absence de tels agents dans la préparation.

SUMMARY

PECTIN-TRANSELIMINASES AND THEIR POSSIBLE USES IN THE TECHNOLOGY OF FRUIT JUICES

Pectolytic enzymes are used in the technology of fruit juices to degrade pectins and break their association with other constituents. Commercial preparations generally contain several types of enzymes :

— pectin methylesterases which hydrolyze the pectin to methanol and pectate ;
— polygalacturonases which hydrolyze the α-(1 → 4) glycosidic bonds of pectates giving galacturonic acid or soluble oligo-uronides ;
galacturonic acid or soluble oligo-uronides ;
— polymethylgalacturonases which hydrolyze glycosidic bonds in pectins without preliminary intervention of pectin methylesterases.

We have studied another type of enzyme, a pectin-transeliminase of fungal origin. This enzyme causes the random cleavage of α-(1 → 4) glycosidic bonds of pectin giving fragments with a double bond at carbon 4 of the pyranuronic ring of the final D-galacturonic acid. The use of this enzyme has the advantage of liberating less methanol from pectins if its action is compared with the action of associated pectin methylesterases and polygalacturonases.

The application of this enzyme has given interesting results in the technology of fruit juices.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE PEKTINTRANSELIMINASEN UND IHRE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN IN DER FRUCHTSAFT-TECHNOLOGIE

Die pektolytischen Enzyme finden ihre Anwendung in der Fruchtsaft-Technologie zum Abbau der Pektine und zur Spaltung ihrer Assoziationen mit anderen Konstituenten. Die Handelspräparate enthalten meist mehrere Enzyme :

— Pektin-Methylesterasen, die Pektin in Methanol und Pektat spalten.
— Polygalakturonasen, die glykosidische α (1, 4) — Bindungen der Pektate spalten und Galakturonsäure und lösliche Oligouronide geben.
— Polymethylgalakturonasen, die die glykosidischen Bindungen, ohne vorherige Interventionen von Pektin-Methylesterasen spalten.

Es wurde von uns ein anderes Enzym untersucht, eine Pektintranseliminase aus Schimmelpilzen.

Dieses Enzym bewirkt die Spaltung von glykosidischen α (1, 4) — Bindungen des Pektins, wobei Fragmente mit einer Doppelbindung zwischen Kohlenstoff 4 und 5 in den Pyranring des nicht reduzierenden terminalen D-Galakturonsäure-Restes auftreten.

Die Anwendung dieses Enzyms hat den Vorteil, nur wenig Methanol aus den Pektinen im Vergleich mit den Pektin-Methylesterasen und begleitende Polygalaktorunidasen freizusetzen

Die Anwendung dieses Enzyms in der Apfelsinensaft-Technologie hat interessante Ergebnisse gezeigt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Demain A.L., Phaff H.J., 1957. *Wallerstein Lab. commun.*, **20**, 119-140.

(2) Reymond D., Phaff H.J., 1965. *J. Food Sci.*, **30**, 266-273.

(3) Endo A., 1965. *Agr. Biol. Chem. Japan.*, **27**, 741-757 (1963), **28**, 535-558, 639-645 (1964) ; **28**, 234-238 (1964) ; **29**, 119-136, 1965.

(4) Marteau G., 1968. Activités enzymatiques et technologie des denrées alimentaires, Centre national de la recherche scientifique, Paris.

(5) Albersheim P., Neukom H., Deuel H., 1960. *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1422-1426.

(6) Bateman D.F., Millar R. L., 1966. *Ann. Rev. Phytopath.*, **4**, 119-146.

(7) Bush D. A. Communication privée.

(8) Roboz E., Barrat R. W., Tatum E. L., 1952. *J. Biol. Chem.*, **195**, 459-471.

(9) Albersheim P., Killias U., 1962. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 107-115.

(10) Bouscharain H., Boivin R., 1967. Ann. Fals. Exp. Chim., **676**, 188-192.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 555-565.

UTILISATION EN CONTINU D'INVERTASE FIXÉE SUR SUPPORTS SOLIDES POSSIBILITÉS D'APPLICATION AUX INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES

P. MONSAN et G. DURAND

Laboratoire de Génie biochimique,
Institut national des Sciences appliquées de Toulouse
31 400 Toulouse

RÉSUMÉ

Deux méthodes de préparation de dérivés enzymatiques insolubles par fixation sur des supports minéraux tels que la bentonite et la brique sont décrites. Les dérivés ainsi obtenus présentent des qualités de résistance aux différents facteurs de dénaturation nettement accrues par rapport à l'enzyme libre : la dénaturation thermique est atténuée et la perte d'activité au cours de la conservation, en présence ou en absence de substrat, est fortement diminuée. Un exemple de fonctionnement en continu d'un réacteur enzymatique à lit fixe est développé ; après 3 mois d'emploi à 40°C, le taux de désactivation n'est que de 10 p. 100. Ces propriétés remarquables des dérivés enzymatiques insolubles permettent d'envisager leur utilisation pour la mise en œuvre de réactions industrielles dans des conditions de rentabilité et d'efficacité satisfaisantes, notamment dans les industries agricoles et alimentaires. Les possibilités d'application de cette nouvelle technologie dans la fabrication de la bière, du vin, de jus de fruits sont montrées.

INTRODUCTION

De nombreuses méthodes de préparation de dérivés enzymatiques insolubles ont été décrites au cours de ces dernières années. Elles ont été répertoriées par plusieurs auteurs (Manecke, 1962 ; Silman et Katchalski, 1966 ; Kay, 1968 ; Goldstein, 1969 ; Guilbot, 1970 ; Brown et Racois, 1971). La fixation d'enzymes sur des supports insolubles suscite de nos jours un intérêt croissant pour deux raisons principales. D'une part, du point de vue théorique, elle permet de mieux comprendre et d'étudier l'influence du microenvironnement sur le fonctionnement *in vivo* des enzymes à l'état fixé, que ce soit sur les membranes ou les organites cellulaires (Katchalski, 1968), dans les systèmes multienzymatiques, (Mosbach, 1971), et même dans les sols (Mc Laren *et al.*, 1970).

D'autre part, du point de vue pratique, il est inutile de souligner l'avantage que

présente la possibilité d'emploi aisé de tels biocatalyseurs soit à des fins analytiques en raison de leur spécificité, soit à des fins industrielles en raison de leur efficacité.

Jusqu'à présent, l'utilisation des enzymes solubles à une échelle importante dans la mise en œuvre de réactions continues a essentiellement été limitée par leur prix élevé, leur dénaturation en cours de fonctionnement et l'impossibilité de récupération en fin de réaction.

La fixation des enzymes sur des supports insolubles résout totalement ce dernier problème : il est très facile de séparer le dérivé insoluble du milieu et de le réutiliser. Elle résout aussi en partie le problème précédent : la fixation se traduit dans la plupart des cas par une augmentation de la résistance aux différents facteurs de dénaturation. Par contre, elle n'apporte aucune amélioration au problème du prix : les dérivés insolubles disponibles sur le marché sont chers ; chers, parce que leur production se fait sur une échelle limitée, que les supports sont en général des composés synthétiques et que les méthodes de fixation sont généralement extrêmement sophistiquées. De plus, les supports employés sont très souvent sensibles à l'attaque des micro-organismes, ce qui limite leur possibilité d'emploi dans des installations de taille importante.

L'utilisation des enzymes dans des réactions industrielles passe donc par la mise au point de méthodes de fixation simples et faciles à mettre en œuvre, sur des supports abondants et résistants aux microorganismes.

Nous décrivons ci-après deux méthodes de préparation de dérivés enzymatiques insolubles répondant à ces critères, par fixation sur des supports minéraux tels que la bentonite et la brique. Les propriétés des dérivés obtenus sont étudiées et comparées à celles de l'enzyme libre. Puis nous montrons les possibilités d'emploi de tels dérivés dans des réactions enzymatiques continues, en les illustrant par l'exemple d'une colonne à lit fixe d'invertase fixée sur la brique. Enfin, nous discutons les nouvelles possibilités d'application qui peuvent s'offrir aux enzymes, du fait de leur utilisation à l'état fixé, dans la préparation des boissons.

PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS DES DÉRIVÉS ENZYMATIQUES INSOLUBLES

A. — *Méthodes de fixation*

La recherche d'un support abondant et non dégradable par les micro-organismes a guidé notre choix vers les composés minéraux, et, en premier lieu, vers une argile, la bentonite, dont les propriétés d'adsorbant sont bien connues (Mc Laren *et al.*, 1958; Durand, 1966). Ces propriétés sont dues à la présence de charges négatives sur les feuillets de bentonite.

A la périphérie du réseau cristallin, cette argile porte des groupes hydroxyles libres (Deuel *et al.*, 1950), qui peuvent se prêter à des réactions de substitution, soit de l'atome d'hydrogène, soit du groupe hydroxyle.

Deux méthodes ont été développées. La première consiste à lier l'enzyme au support par l'intermédiaire d'un agent polyfonctionnel, le chlorure de cyanuryle, qui a servi à fixer différentes enzymes sur cellulose (Surinov *et al.*, 1966 ; Kay *et al.*, 1967).

Le chlorure de cyanuryle est tout d'abord fixé sur la bentonite, en milieu orga-

nique, puis, après lavage et séchage du support, l'enzyme en solution aqueuse réagit à son tour sur les groupes chlorés encore disponibles du réactif trifonctionnel.

Dans la seconde méthode, le groupe hydroxyle est tout d'abord substitué par un atome de chlore, en milieu organique, par action du chlorure de sulfuryle ou du chlorure de thionyle. Le support ainsi activé est ensuite mis en contact avec une solution aqueuse d'enzyme afin de permettre la fixation. Cette méthode s'est révélée plus efficace que la précédente : à masse égale de bentonite, la quantité d'enzyme fixée, en prenant l'invertase, est 2,5 fois plus importante. Ce résultat extrêmement encourageant nous a amené à tenter d'activer de la même façon d'autres supports minéraux tels que le verre, pilé ou sous forme de billes, et la brique. C'est ce dernier support qui permet d'insolubiliser les quantités les plus importantes d'enzyme. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé par l'étude de la fixation d'acides aminés sur ces supports ; la quantité d'arginine fixée est de $15{,}4 \times 10^{-6}$ mole/g de brique, et de $8{,}2 \times 10^{-6}$ mole/g de verre pilé. Dans le cas de la bentonite, l'interférence des phénomènes d'adsorption est trop importante, du fait de la faible taille de la molécule d'acide aminé, pour que les résultats soient significatifs.

Afin de montrer la généralité d'application des deux méthodes précédemment décrites, nous les avons utilisées pour fixer sur les différents supports minéraux cités environ une quinzaine d'enzymes parmi lesquelles non seulement des hydrolases, mais aussi des transférases, des oxydo-réductases et des synthétases. Nous avons notamment préparé le dérivé insoluble de l'amino-acylase, qui est actuellement la seule enzyme employée à l'échelle industrielle, au Japon, pour séparer les antipodes optiques de la méthionine, à partir de leur dérivé acétylé (Firme Tanabe Seiyaku, Usines de Toda et Cuoda).

B. — *Conséquences de la fixation*

Le fait de fixer les enzymes sur des supports insolubles par l'intermédiaire d'un de leurs groupes fonctionnels introduit de nouvelles contraintes dans la molécule d'enzyme. De plus, le microenvironnement est modifié suivant la nature des charges qu'il porte. Le comportement de l'enzyme fixée est donc en général différent de celui qu'elle présente à l'état libre.

Nous avons essentiellement étudié les conséquences de la fixation dans le cas de l'invertase, en prenant la bentonite comme support.

Nous avons pu montrer que la fixation de l'invertase sur un support insoluble se traduit par une nette augmentation de la résistance aux facteurs de dénaturation. Ainsi, on constate que la température optimale de fonctionnement, qui est voisine de 44°C pour l'enzyme libre, s'étend sur une large zone, allant de 40°C à 60°C, pour l'invertase fixée sur bentonite (Monsan et Durand, 1971 *a*). De même, l'activité de ce dérivé insoluble demeure constante au cours de sa conservation en milieu liquide pendant 15 jours à 30°C, alors que, dans les mêmes conditions, une solution d'enzyme libre perd 93 p. 100 de son activité initiale (Monsan et Durand, 1971 *b*).

Cette amélioration très importante des qualités de conservation de l'activité résultant de la fixation de l'enzyme sur un support insoluble permet de rentabiliser l'emploi de tels dérivés dans des réactions continues : il est possible d'envisager une application des biocatalyseurs comparable en tous points à celle des catalyseurs classiques dans de nombreuses réactions du Génie chimique.

Afin de montrer les possibilités d'utilisation des dérivés enzymatiques insolubles dans des réactions continues, nous décrivons le fonctionnement et l'étude du comportement cinétique d'une colonne à lit fixe garnie d'invertase fixée sur des particules de brique.

RÉACTEUR CONTINU A LIT FIXE

Nous avons été amené à choisir ce type de réacteur pour trois raisons. La première est que le diamètre des particules de brique est compris entre 0,5 et 0,8 mm : elles se prêtent donc très bien à un emploi en lit fixe, en raison de la faible perte de charge qu'elles entraînent. D'autre part l'absence d'agitation évite le risque d'attrition (production de fines). Enfin, il est bien connu que, pour les réactions d'ordre supérieur à 0, le réacteur agité alimenté en continu se révèle, à volume égal, moins efficace que le réacteur à lit fixe. Or, dans le cas des réactions enzymatiques, l'ordre de la réaction varie, en général, entre 0 et 1.

A. — *Description de l'appareillage*

Nous avons utilisé une colonne en plexiglass dont les caractéristiques sont :

Diamètre intérieur	50	mm
Diamètre extérieur	60	mm
Hauteur totale	555	mm
Hauteur en lit fixe.....	450	mm
Volume total	935	ml
Volume liquide dans le lit fixe	346	ml
Volume liquide au-dessus du lit fixe	86	ml
Porosité	0,69	

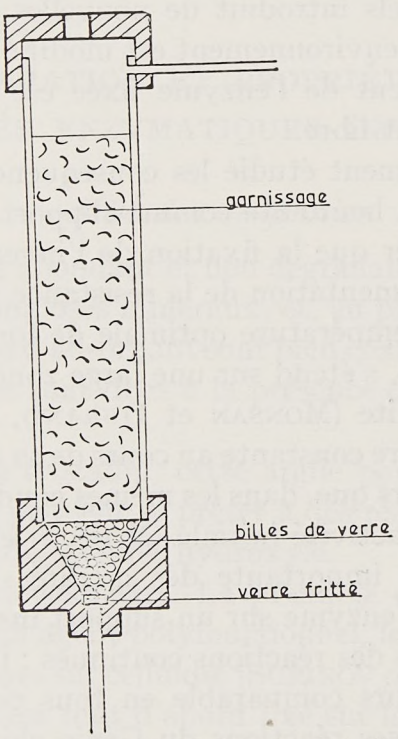


FIG. 1. — *Schéma de la colonne à lit fixe*

La colonne (fig. 1) est alimentée par le bas à travers un cône garni de billes de verre de 1 mm de diamètre, dont le rôle est d'assurer une meilleure distribution du flux d'alimentation.

La colonne est placée dans une enceinte dont la température est régulée à la valeur désirée. Le liquide d'alimentation est une solution de saccharose à différentes concentrations dans du tampon acétate 0,2 M, pH 5,2, saturée en toluène afin d'éviter les risques d'infection.. L'activité de l'invertase est mesurée par dosage des sucres réducteurs libérés dans l'effluent, par la méthode colorimétrique de SOMOGYI-NELSON. Ceci permet de déterminer le taux de conversion à la sortie de la colonne.

B. — *Élaboration d'un modèle théorique*

Le mode d'écoulement liquide dans la colonne considérée peut être assimilé à un écoulement piston : le mélange réactionnel progresse dans un tel réacteur par tranches parallèles et indépendantes n'échangeant pas de matière entre elles. L'équation caractéristique du réacteur piston en régime permanent peut s'écrire :

$$\frac{dX}{dV} = \frac{v}{Q_0 S_0} \tag{1}$$

X : avancement de la réaction
V : volume réactionnel
v : vitesse de la réaction
Q_0 : débit volumique total du fluide dans l'état de référence
S_0 : Somme par rapport à i des S_{i0} (S_{i0} : concentration du constituant i dans l'état de référence).

On peut en déduire le temps de passage t_p nécessaire à une conversion donnée :

$$t_p S_0 = \frac{V}{Q_0} = \int_{X_E}^{X_S} \frac{dX}{V} \tag{2}$$

X_E : avancement de la réaction à l'entrée du réacteur.
X_S : avancement de la réaction à la sortie du réacteur.

Pour une réaction enzymatique, si l'enzyme est employée en quantité catalytique et si la concentration en produit formé est négligeable devant celle des autres constituants, les lois de la cinétique michaélienne permettent de déterminer l'expression de la vitesse v de réaction :

$$v = v_{max} \frac{(S)}{K'_m + (S)} \tag{3}$$

v_{max} : vitesse maximale de réaction
K_m : constante de Michaélis
(S) : concentration en substrat.

L'avancement de la réaction ou taux de conversion est défini comme étant :

$$X = \frac{S_0 - (S)}{S_0} \tag{4}$$

L'équation (3) peut donc s'écrire :

$$v = v_{max} \frac{S_0(1 - X)}{K_m + S_0(1 - X)} \tag{5}$$

La combinaison des équations (2) et (5) donne, en considérant la constante de Michaélis apparente K'_m de l'enzyme fixée :

$$\frac{V}{Q_0} = S_0 \int_{X_E}^{X_S} \frac{K_m + S_0(1 - X)}{v_{max}\, S_0(1 - X)}\, dX \qquad (6)$$

En prenant comme état de référence celui à l'entrée de la colonne et le taux de conversion nul en ce point ($X_E = 0$), on obtient l'équation cinétique du réacteur à lit fixe de dérivé enzymatique insoluble en fonctionnement continu :

$$\frac{V}{Q_E} \times v_{max} = S_E X_S - K'_m \ln (1 - X_S) \qquad (7)$$

Nous avons étudié la validité de ce modèle en le comparant aux résultats expérimentaux obtenus en mesurant l'influence des variations du débit Q_E et de la concentration en substrat S_E sur le taux de conversion à la sortie de la colonne.

C. — *Résultats expérimentaux*

Pour une solution d'alimentation de concentration fixée en saccharose, le taux de conversion dans l'effluent de la colonne est mesuré à différents débits. Puis la colonne est abondamment rincée par du tampon acétate 0,2 M, pH 5,2, et la manipulation est répétée avec une concentration différente en saccharose. Cette série d'expériences a été menée à 40°C. Les résultats sont regroupés dans la figure 2. Les taux de conversion obtenus sont peu élevés en raison de la faible quantité d'invertase fixée sur la brique, afin de permettre un dosage commode du glucose en sortie de colonne. On peut constater que le taux de conversion augmente très rapidement lorsque le débit devient inférieur à 150 ml/h.

D'après l'équation (7), si, pour un débit Q_E constant, on porte les variations du produit $S_E X_S$ en fonction de $\ln (1 - X_S)$, on doit obtenir une droite, à condition que K_m et v_{max} demeurent constants à ce débit. La pente de cette droite est égale à K'_m et son intersection avec l'axe des ordonnées donne la valeur du produit

$$\frac{V}{Q_E} \times v_{max}$$

On peut voir sur la figure 3 que nos points expérimentaux ne s'alignent pas très bien, et d'autant moins que X_S a une valeur élevée. On peut conclure que pour un débit donné Q_E, K'_m et v_{max} ne demeurent pas constants. Ceci est dû à l'effet des produits de la réaction sur le fonctionnement de l'invertase : lorsque la concentration en produit devient trop importante, l'équation de Michaélis ne permet plus de décrire convenablement la vitesse de la réaction enzymatique.

Bien que les résultats ne soient qu'approchés, nous avons utilisé ce modèle linéaire pour étudier l'influence du débit sur K_m et v_{max}. A l'aide d'une méthode de régressions multiples traitée sur calculateur CII 90-10 et programmée en langage FORTRAN IV, nous avons déterminé la droite optimale au sens de moindres carrés pour chaque valeur du débit Q_E.

Nous avons ainsi pu obtenir la variation de la valeur des paramètres K_m et v_{max} en fonction des débits.

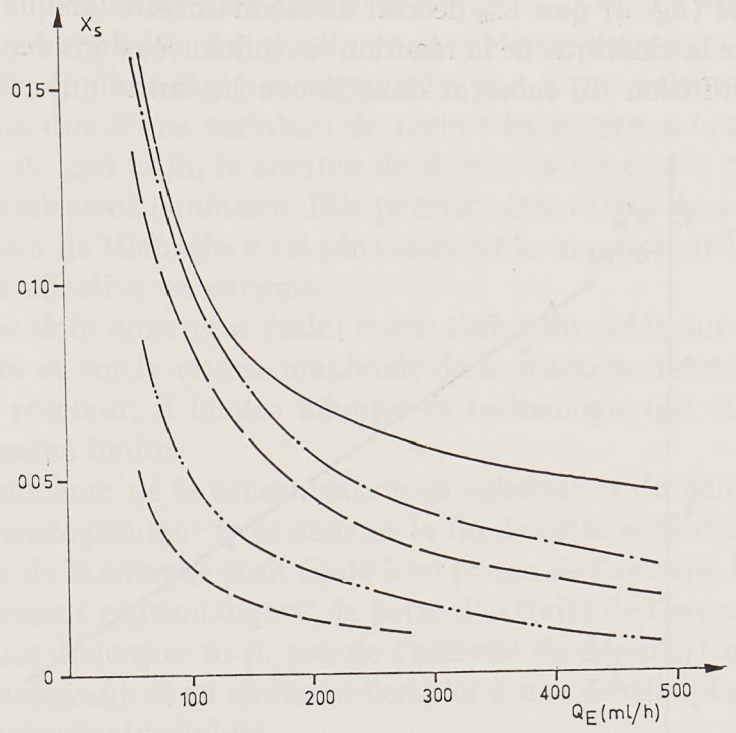


FIG. 2. — *Effet du débit sur le taux de conversion pour différentes valeurs de la concentration en saccharose dans la solution d'alimentation*

S_E = 0,1 M (— — — —) S_E = 0,05 M (— ·· — ·· —)
S_E = 0,01 M (—— ——) S_E = 0,005 M (— · — · — · —)
S_E = 0,001 M (————)

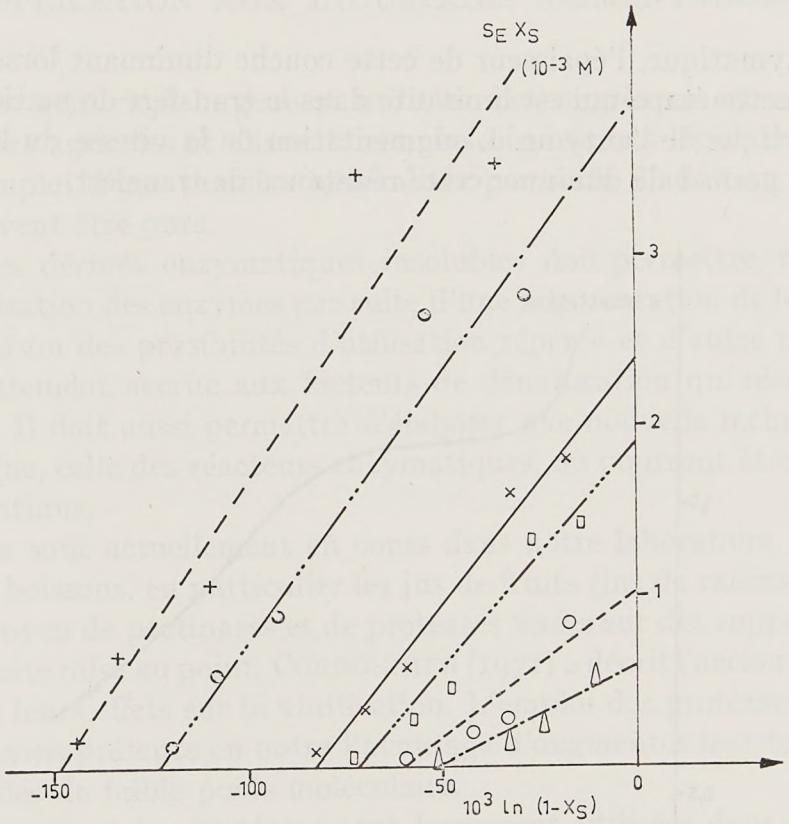


FIG. 3. — *Variation de la valeur du produit $S_E X_S$ en fonction de Ln* (1 — X_S) *pour différents débits*

Q_E = 400 ml/h (— · — · — · —) Q_E = 300 ml/h (- - - - - - - - - -)
Q_E = 200 ml/h (—— · · · · ——) Q_E = 160 ml/h (————)
Q_E = 100 ml/h (—— · · ——) Q_E = 80 ml/h (— — — —)

On constate (fig. 4) que K'_m décroît de façon linéaire lorsque le débit augmente. Ceci montre que la cinétique de la réaction est influencée dans des proportions importantes par la diffusion du substrat dans la couche limite qui entoure les particules

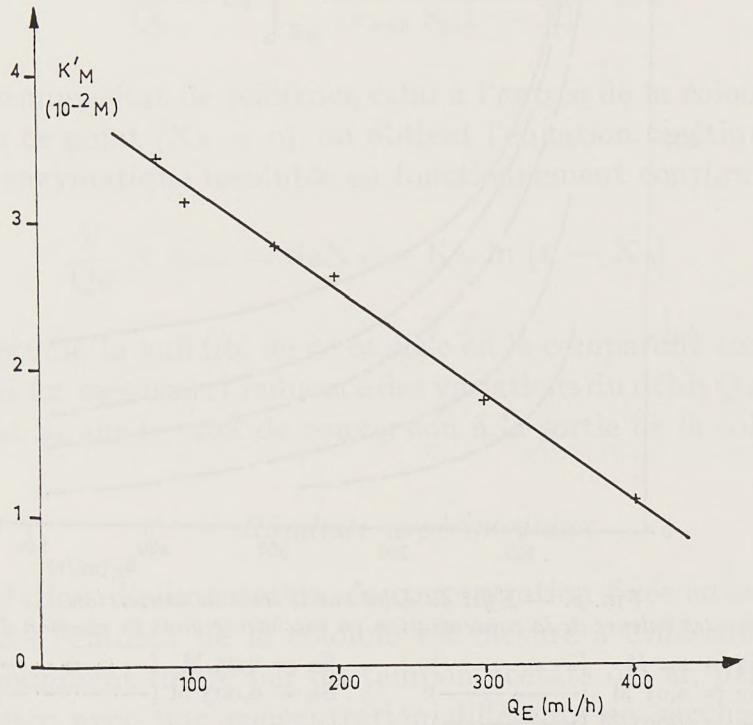


FIG. 4. — *Effet du débit sur la valeur de la constante de Michaélis apparente*

de dérivé enzymatique, l'épaisseur de cette couche diminuant lorsque le débit augmente. C'est cette étape qui est limitante dans le transfert de matière de la solution au site catalytique de l'enzyme. L'augmentation de la vitesse du liquide au niveau des particules permet de diminuer cette résistance de transfert.

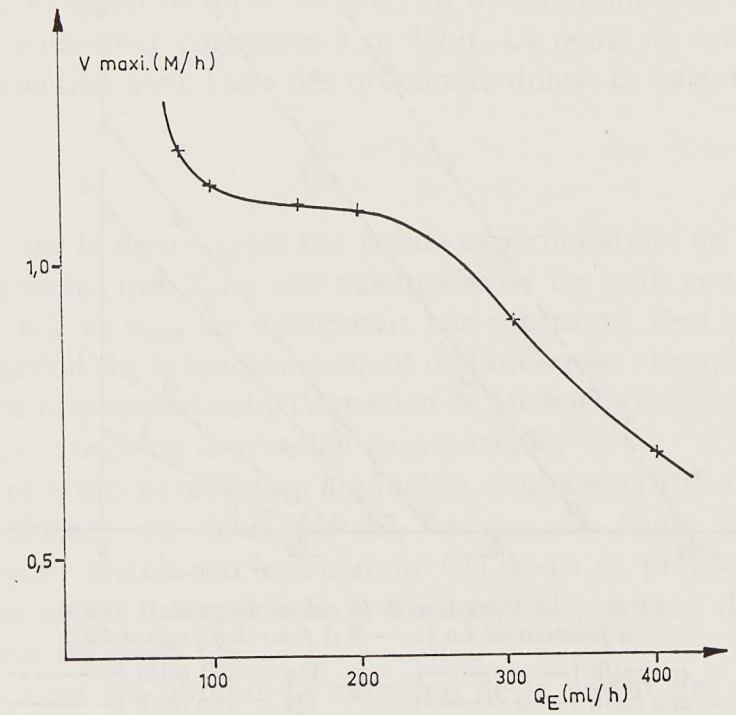


FIG. 5. — *Effet du débit sur la valeur de la vitesse maximale* v_{max}

La vitesse maximale de la réaction enzymatique, v_{max}, tend à augmenter lorsque le débit est inférieur à 100 ml/h (fig. 5), elle est sensiblement constante entre 100 ml/h et 200 ml/h, puis elle diminue rapidement pour les plus fortes valeurs du débit. Cette diminution n'est pas due à une variation du régime hydrodynamique de la colonne, car pour un débit de 400 ml/h, le nombre de Reynolds est égal à 7×10^{-2}, ce qui correspond à un écoulement laminaire. Elle pourrait être attribuée au fait que, dans cette zone, l'équation de Michaélis n'est plus intégrable en raison de la non constance de la concentration effective en enzyme.

Un compromis doit donc être établi entre l'effet du débit sur la constante de Michaélis apparente et sur la vitesse maximale de la réaction. Pour un même temps de séjour dans le réacteur, il faudra adopter la technologie qui diminuera le plus l'épaisseur de la couche limite.

L'étude de l'influence de la concentration en substrat et du débit sur le taux de conversion a été menée pendant trois mois. A la fin de cette série d'expériences, l'activité enzymatique de la colonne était égale à 90 p. 100 de l'activité initiale. En trois mois de fonctionnement continu à 40°C, la perte d'activité de l'invertase fixée sur la brique ne représente donc que 10 p. 100 de l'activité de départ. Un tel résultat est extrêmement encourageant si on envisage l'emploi à une échelle plus importante de tels dérivés enzymatiques insolubles.

APPLICATION AUX INDUSTRIES ALIMENTAIRES

Les enzymes sont déjà largement utilisées, ce congrès en est un témoignage, dans les industries agricoles et alimentaires, des dispositions législatives empêchent toutefois leur emploi d'une manière généralisée par suite d'addition exogène à des produits qui doivent être purs.

L'emploi des dérivés enzymatiques insolubles doit permettre, théoriquement, de faciliter l'utilisation des enzymes par suite d'une augmentation de leur rentabilité, d'une part en raison des possibilités d'utilisation répétée et d'autre part du fait de la résistance nettement accrue aux facteurs de dénaturation qui résulte en général de leur fixation. Il doit aussi permettre d'élaborer une nouvelle technologie dans le Génie biochimique, celle des réacteurs enzymatiques, où pourront être mis en œuvre des procédés continus.

Des travaux sont actuellement en cours dans notre laboratoire, portant sur la clarification des boissons, en particulier les jus de fruits (jus de raisins et d'agrumes) et la bière, au moyen de pectinases et de protéases fixées sur des supports insolubles. Dans une excellente mise au point, CORDONNIER (1971) a décrit l'action de ces enzymes dans le raisin et leurs effets sur la vinification. L'emploi des protéases dans la clarification des boissons présente en outre l'avantage d'augmenter leur teneur en acides aminés et peptides de faible poids moléculaire.

Si les pectinases et les protéases sont largement utilisées dans la préparation des jus de fruits, leur addition demeure interdite en cours de vinification. Or, les dérivés enzymatiques insolubles peuvent être récupérés en fin de réaction : on ne peut donc parler d'addition exogène. Ces dérivés permettent donc d'effectuer les

réactions biochimiques sans ajouter aucune substance au milieu à traiter et ce fait pourrait rendre licite l'utilisation des enzymes en vinification.

Bien que les résultats obtenus au niveau du laboratoire soient extrêmement encourageants, il est certain que l'emploi des enzymes fixées à l'échelle industrielle posera d'importants problèmes. Il faudra notamment adopter de nouveaux types de technologie afin d'augmenter l'efficacité de l'action catalytique en réduisant au minimum les résistances au transfert de matière au niveau des particules de dérivé enzymatique. Il apparaît que les réacteurs enzymatiques permettront de mieux contrôler l'action des biocatalyseurs, par exemple en jouant sur le temps de séjour du milieu à traiter, d'où des possibilités accrues d'optimisation. De plus, en jouant sur la nature électrique du support insoluble, on peut déplacer le pH optimum de l'enzyme soit vers les milieux acides (support chargé positivement), soit vers les milieux basiques (support chargé négativement).

On peut donc utiliser les dérivés enzymatiques insolubles pour traiter des solutions dont le pH était tel que les enzymes solubles se révélaient totalement inefficaces.

Pour conclure, nous dirons que la fixation des enzymes sur des supports insolubles, en raison d'une part de la plus grande stabilité des dérivés obtenus et d'autre part de leur meilleure souplesse d'emploi, doit permettre une utilisation accrue et plus rentable des enzymes dans les réactions industrielles, en particulier dans le domaine agricole et alimentaire.

SUMMARY

THE USE OF ENZYMES FIXED ON SOLID SUPPORTS IN THE PREPARATION OF BEVERAGES

Two methods of preparing insoluble enzymatic derivatives by fixation to mineral supports such as bentonite and brick are described. The derivatives thus obtained present distinctly superior qualities of resistances to different factors of denaturation compared with free enzymes : thermic denaturation is diminished and loss of activity during conservation, in the presence or absence of substrat is greatly lessened. An example of conditions functioning of an enzymatic reactor with fixed bed is developed ; after 3 months'use at 40°C, disactivation rate is only 10 p. 100. These remarkable properties of insoluble enzymatic derivatives permit one to consider their use in the setting up of industrial reactions, both efficiently and in economically satisfying conditions, notably in the agricultural and food industries. The application possibilities of this new technology in the manufacture of beer, wine, fruit juice and in the milk industry are shown.

ZUSAMMENFASSUNG

GEBRAUCH VON AUF SOLIDEN TRÄGERN FIXIERTEN ENZYMEN FÜR DIE GETRÄNKEHERSTELLUNG

Es werden zwei Methoden für die Herstellung von unlöslichen Enzym. Präparaten durch Fixierung auf mineralische Fräger, wie Bentonit oder Ziegel, beschrieben. Solche Präparate zeigen eine Widerstands-qualität gegenüber verschiedenen Denaturierungsfaktoren, die wesentlich besser ist als die des freien Enzyms : die Hitzedenaturierung ist herabgesetzt und der Akti-

vitätsverlust während der Lagerung, in Gegenwart oder in Abwesenheit des Substrats, ist weitgehend vermindert.

Es wird ein Beispiel für die kontinuierliche Arbeitsweise eines Enzym-Reaktors mit festem Bett gegeben. Nach drei Betriebsmonaten, bei 40°C, beträgt der Desaktivierungsgrad nur 10 p. 100 Diese bemerkenswerten Eigenschaften der unlöslichen Enzym-Präparate erlauben es, deren Gebrauch für industrielle Zwecke unter zufriedenstellenden Bedingungen für Rentabilität und Wirksamkeit ins Auge zu fassen. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser neuen Technologie für die Herstellung von Bier, Wein, Fruchtsaft und in der Milchindustrie werden aufgezeigt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brown E., Racois A., 1971. Les enzymes insolubilisées. *Bull. Soc. Chim. France*, **12**, 4613-4617.

Cordonnier R., 1971. De quelques effets en vinification des enzymes du raisin. *Revue française d'Œnologie*, **41**, 5-19.

Deuel H., Huber G., Iberg R., 1950. Organische Derivate von Tonmineralien. *Helv. Chim. Acta*, **33**, 1229-1232.

Durand G., 1966. *Contribution à l'étude de la biologie du sol : sur le catabolisme des acides nucléiques et de leurs dérivés.* Thèse Doc. Sci., Univ. Toulouse.

Goldstein L., 1969. Use of water-insoluble enzymes in synthesis and separation. In : *Fermentation advances*, Ed. Perlman D., Academic Press, 391-424.

Guilbault G. G., 1970. Use of enzymes in and kinetics aspects of analytical. *Chemistry. Anal. Chem.*, **42**, 5, 334 R-349 R.

Katchalski E., 1968. Preparation and properties of enzymes immobilized in artificial membranes. *Sym. Funct. Biol. Syst. Macromol. Level, Proc. Nobel Symp.*, Pub. 1969, 283-304.

Kay G., 1968. Insolubilized enzymes. *Process Biochem.*, **3**, 8, 36-39.

Kay G., Crook E. M., 1967. Coupling of enzymes to cellulose using chloro-s-striazines. *Nature*, **216**, 514-515.

Mc Laren A. D., Packer L., 1970. Some aspects of enzyme reaction in heteregeneous systems. *Adv. in Enzymol.*, **33**, 245-308.

Mc Laren A. D., Peterson G. H., Barsaad I., 1958. The adsorption and reactions of enzymes and proteins on clay minerals. IV. Kaolinite and montmorillonite. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **22**, 239-244.

Manecke G., 1962. Reactive polymers and their use for the preparation of antibody and enzyme resins. *Pure appl. chem.* **4**, 507-520.

Monsan P., Durand G., 1971 *a*. Preparation d'invertase insolubilisée par fixation sur bentonite. *F. E. B. S. Letters*, **16**, 1, 39-42.

Monsan P., Durand G., 1971 *b*. Nouvelle méthode de préparation d'enzymes fixées sur des supports minéraux. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **273**, 33-36.

Mosbach K., 1971. Matrix bounds enzymes. I. The use of different acrylic copolymers as matrices. *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2084-2092.

Silman I. H., Katchalski E., 1966. Water-insoluble derivatives of enzymes antigens and antibodies. *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 873-908.

Surinov B. P., Manoilov S. E., 1966. *Biokhimiya*, **31**, 387, cité par Kay G., 1968.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 567-587.

L'EMPLOI DES ENZYMES EN ŒNOLOGIE

G. MARTEAU

Station de Technologie végétale,
École nationale supérieure agronomique de Montpellier, I. N. R. A.,
34 - Montpellier

RÉSUMÉ

Après avoir étudié dans quelle mesure l'utilisation œnologique des enzymes est conforme à la notion doctrinale du vin naturel, l'auteur envisage quelques applications éventuelles : l'emploi des enzymes pectolytiques en vue de faciliter l'extraction, la clarification ou la filtration du moût ou du vin, doit être raisonné en fonction du propre équipement enzymatique du raisin.

Peut être également envisagée l'utilisation de protéases en vue de prévenir les troubles protéiques ou de la glucose-oxydase associée à la catalase en vue de prévenir les transformations oxydatives nuisibles.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Le vin est défini comme une boisson naturelle provenant exclusivement de la fermentation du raisin ou du moût de raisin frais. Dans l'ensemble des pays producteurs, ce caractère naturel du produit est généralement souligné ; sa protection, grâce à une législation limitant au maximum les traitements chimiques en œnologie, est l'objet de recommandations fréquentes de l'Office international du Vin. Vis-à-vis des consommateurs cependant, le vin n'échappe pas à la tendance moderne qui rend ces derniers de plus en plus sensibles aux qualités de présentation et à la standardisation des produits alimentaires. Devant ces exigences, le vinificateur qui n'est pas maître d'une matière première particulièrement variable dans sa composition, se trouve quelque peu désarmé, et souvent fort en peine d'appliquer les conseils qui lui sont généralement prodigués, de renoncer aux traitements chimiques de correction pour se borner à guider dans le sens le plus favorable l'évolution biologique naturelle

du milieu. Or les moyens disponibles pour atteindre cet objectif sont fort limités ; ils permettent une certaine maîtrise des transformations microbiennes, encore bien imparfaite cependant ; le contrôle par exemple de la fermentation malolactique pose encore des problèmes sérieux à l'œnologue, en raison notamment de l'insuccès fréquent des techniques d'ensemencement.

C'est depuis beaucoup moins longtemps que l'on se préoccupe, en œnologie, d'assurer la maîtrise des transformations enzymatiques dont on saisit maintenant toute l'importance. Or, les moyens physiques et chimiques disponibles en vue de favoriser les activités utiles à la qualité du vin, au détriment des activités nuisibles, s'avèrent nettement insuffisants en raison notamment de leur manque de sélectivité.

C'est dans ce contexte que l'on doit raisonner pour juger de l'opportunité de compléter à un stade donné, l'équipement enzymatique naturel du raisin ou du vin, par des enzymes exogènes, susceptibles d'accélérer ou même de rendre possibles les transformations souhaitées.

Le problème posé est avant tout un problème de doctrine : il n'est pas en effet suffisant de savoir si un traitement enzymatique donné sera favorable à la technologie du vin, sans nuire bien sûr à sa valeur hygiénique ou alimentaire ; ces conditions étant satisfaites, il convient encore de définir si un tel traitement est conforme à la notion doctrinale de produit naturel dont j'ai souligné plus haut l'importance. L'intervention par ensemencement microbien n'est nullement contestée, malgré les inconvénients multiples pouvant résulter d'effets secondaires nuisibles, eux-mêmes dépendant d'ailleurs de l'équipement enzymatique de l'espèce microbienne introduite. L'intervention enzymatique apparaît en comparaison, beaucoup plus spécifique et par conséquent, davantage susceptible *à priori*, de garantir la maîtrise souhaitée des transformations biologiques du moût de raisin et du vin.

Notons qu'un premier pas peut être franchi dans cette voie, lors d'opérations œnologiques ne posant pas de problème sur le plan légal ; en voici un exemple typique : Datounaschvili (1967) a mis en évidence l'amélioration de la qualité du vin, résultant de l'addition de faibles quantités (1 p. 100 à 2 p. 100), d'une préparation enzymatique, elle-même obtenue par macération prolongée à basse température, d'une certaine quantité de vin avec un excès de levures. L'action favorable, accompagnée d'un abaissement du potentiel d'oxydo-réduction du vin, est mise sur le compte de la diffusion de déhydrases faisant partie de l'équipement enzymatique de la levure. Cette technique constituerait un progrès net, par rapport à ce que l'on peut attendre de la mise en contact directe des levures et du vin à traiter, telle qu'elle est couramment pratiquée, qui s'accompagne bien d'un abaissement du potentiel d'oxydo-réduction mais aussi de la diffusion de produits d'autolyse de la levure et notamment de certains acides aminés responsables ou précurseurs de mauvais goûts.

Voilà donc un progrès lié à une amélioration de la spécificité de l'intervention. Pourquoi ne pas aller plus loin dans le sens de cette spécificité ? C'est là un argument favorable à l'utilisation en œnologie, de préparations commerciales offrant cependant toutes garanties du point de vue de l'efficacité de leur action, de l'absence d'activités parasites, de la pureté de leur support, etc.

Ces derniers points seront largement discutés au cours de ce symposium et je ne les aborderai pas ici.

Le problème de l'emploi des enzymes en œnologie, doit également se poser dans

les perspectives évolutives de l'œnologie moderne. Il n'est pas impossible que, faute de moyens suffisants mis à la disposition du vinificateur pour maîtriser les transformations microbiennes et enzymatiques, une véritable révolution intervienne un jour dans la technologie du vin, qui exploiterait le progrès des méthodes de stabilisation pour détruire initialement toute la flore microbienne et tout l'équipement enzymatique naturel du moût, ce qui ouvrirait la voie à une œnologie microbiologiquement et enzymatiquement dirigée. De ce fait, serait en particulier réglé le problème crucial des oxydo-réductases et de la détérioration de la qualité des vins résultant de leur présence en abondance dans la matière première. Mais dès lors, il conviendrait de restituer au moût, les enzymes indispensables par exemple à la clarification, sans compter toutes celles que l'on pourrait détruire aveuglément sans connaître encore leur nature et leur rôle.

Ce dernier point doit nous inciter à la prudence : si, en effet, l'intervention enzymatique nous paraît conforme à la doctrine du vin naturel, à notre avis, elle se justifie actuellement d'autant mieux que le vinificateur ne s'en est pas rendu totalement dépendant, en respectant au maximum les activités naturelles utiles du raisin.

QUELQUES APPLICATIONS ŒNOLOGIQUES

A. — *Les enzymes pectolytiques*

Il n'est guère possible d'évoquer les problèmes liés à la pectolyse enzymatique, sans rappeler très sommairement la classification des enzymes pectolytiques : si le schéma proposé par Demain et Phaff (1957), demeure toujours valable, il doit être complété en fonction de la découverte plus récente (Albersheim, Neukom et Deuel (1960) des *trans*-éliminases ou lyases, susceptibles de dégrader les pectines selon un mécanisme non hydrolytique (fig. 1). Il ne semble pas que ces dernières puissent beaucoup intervenir dans le domaine œnologique, étant donné notamment le pH bas du moût de raisin ou du vin, très éloigné du pH optimum des *trans*-éliminases microbiennes, surtout d'origine bactérienne, décrites jusqu'à présent.

L'utilisation des enzymes pectolytiques en œnologie, pose, au niveau de la compréhension des phénomènes, des problèmes particulièrement difficiles à résoudre, étant donné la complexité du milieu biologique concerné, son instabilité notamment du point de vue de son contenu pectique et la très courte période de l'année (3 semaines à 1 mois) offerte aux investigations directes.

Si beaucoup de travaux, en effet, ont été consacrés à l'étude des enzymes pectolytiques en général, la plupart d'entre eux se limitent soit à l'étude *in vitro*, des propriétés d'une enzyme hautement purifiée, à partir d'un milieu naturel donné, soit à l'étude des conséquences technologiques de l'emploi de telle ou telle préparation, sur un substrat naturel complexe, le jus de raisin ou le vin par exemple. Sans doute, pour les raisons mentionnées plus haut, fort peu d'études ont été publiées, tentant de relier ces deux aspects du problème, en vue par exemple d'établir une corrélation entre les spectres enzymatiques respectifs, d'une préparation donnée ou du raisin et les effets technologiques qui en résultent.

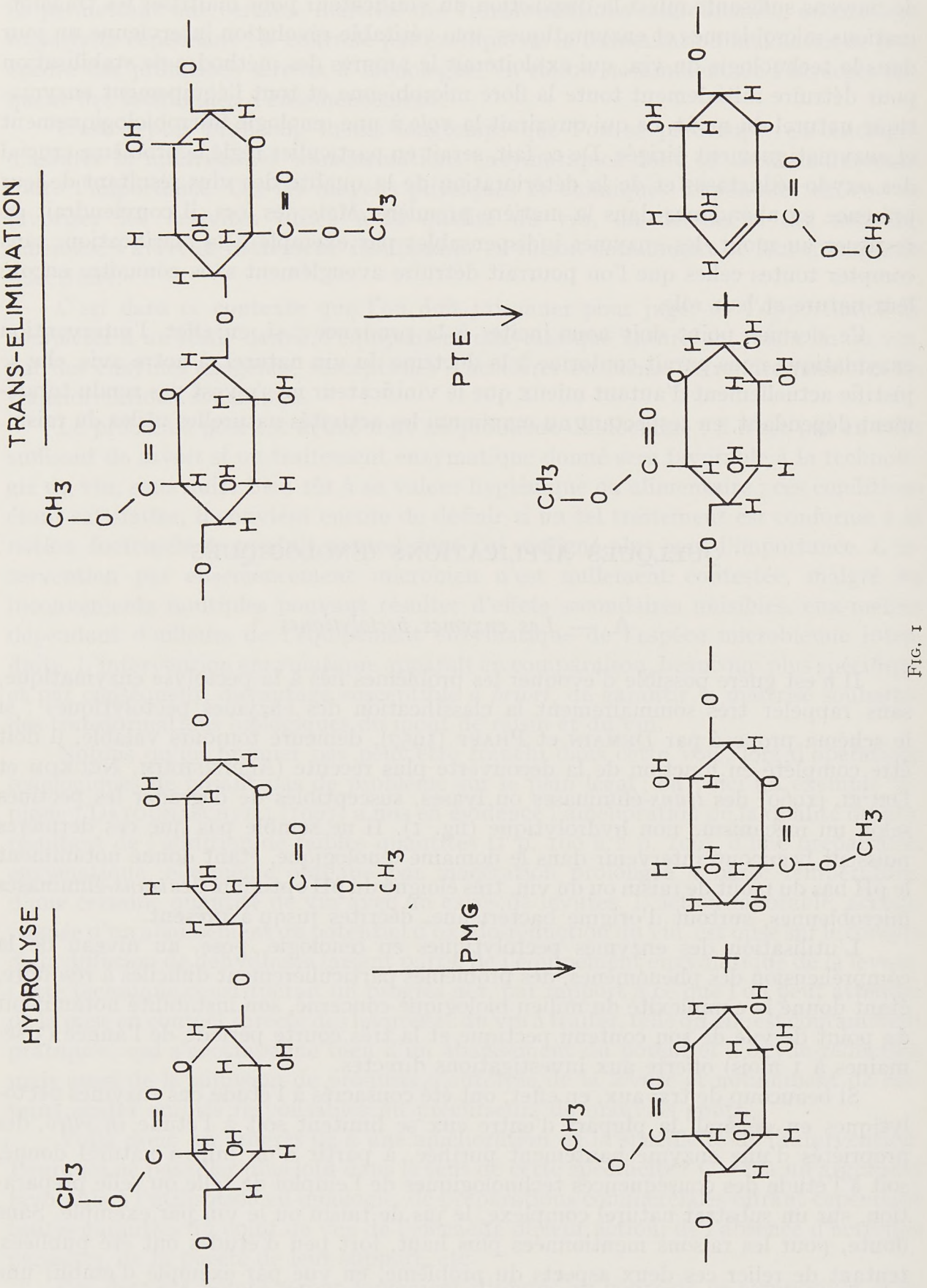


FIG. 1

Spectre enzymatique des préparations commerciales.

La façon la plus rigoureuse de l'établir, suppose la réalisation préalable d'un gros travail de séparation et de purification, de chacune des protéines enzymatiques de la préparation, ce qui suppose un équipement adapté qui, au sein des grands organismes de recherche, gagnerait sans doute à être centralisé dans un ou plusieurs laboratoires spécialisés.

Dans les laboratoires les plus orientés vers la résolution des problèmes technologiques, les mesures d'activité sont effectuées directement sur la préparation complexe étudiée, sans purification préalable, dans des conditions telles par conséquent, que plusieurs enzymes puissent être rendues conjointement responsables d'une transformation donnée.

TABLEAU I

Préparations	Activité PE méq. méthanol libéré/mg (H) × 10^{-3}		Groupements réducteurs libérés (méq./mg) (H) × 10^{-3}		Abaissement de viscosité relative/mn (%)
	Pectine		sur pectine	sur acide pectique	Pectine
	pH 5,0	pH 4,0	pH 4,0	pH 4,0	pH 4,0
1	0,50	0,30	0,28	2,03	1,21
2	1,77	1,31	0,70	2,76	6,07
3	0,53	0,35	0,34	2,03	2,70
4	0,34	0,20	0,22	1,79	2,70
5	0,13	0,10	0,17	2,0	3,6
6	2,53	2,1	2,25	45,5	40,5
A	10,0	6,8	9,0	124	830
B	2,6	2,4	2,8	45	166
C	6,8	5,0	7,9	45	102

Les mesures viscosimétriques opérées sur un substrat de pectine fortement méthoxylée, témoignent évidemment surtout des activités « *endo* » responsables de l'attaque au hasard de la liaison glucosidique, qu'il s'agisse de l'endopolyméthylgalacturonase agissant directement sur le substrat naturel ou de l'endopolygalacturonase nécessitant la déméthoxylation préalable de ce dernier sous l'action de la

FIG. 1

Polygalacturonases (PG)

Substrat principal : pectine

- *Endo*-PMG 3, 2, 1, 41
- *Exo*-PMG ?

Substrat principal : Acide pectique

- *Endo*-PG 3, 2, 1, 15
- *Exo*-PG 3, 2, 1, 40

Pectine *trans*-éliminases (PTE)

Substrat principal : pectine

- *Endo*-PTE 4, 2, 2, 3
- *Exo*-PTE ?

Substrat principal : Acide pectique

- *Endo*-PATE 4, 2, 2, 1
- *Exo*-PATE 4, 2, 2, 2

pectine méthyle estérase (PE). La mesure des groupements réducteurs libérés, qui se poursuit bien après l'abaissement limite de viscosité, témoigne davantage des activités « *exo* », exopolyméthylgalacturonase ou exopolygalacturonase. L'activité Pectine estérase, par contre, peut être dosée d'une façon beaucoup plus spécifique, par la mesure du méthanol libéré.

La comparaison (tabl. 1), dans les limites de signification que nous venons de définir, du spectre des activités, dans quelques préparations commerciales, mesurées respectivement en 1963 (1 à 6) et en 1971 (A, B, C), montre assez bien l'évolution intervenue dans ce domaine au cours des dernières années.

Cette évolution se résume ainsi :

1° Les activités rapportées au gramme de produit sont accrues dans des proportions considérables, ce qui conduit à des doses d'utilisation pouvant devenir très réduites et avec donc, un moindre risque d'ajouter au vin des produits étrangers indésirables.

2° Le spectre des activités est modifié, avec, semble-t-il, une nette tendance à exploiter davantage l'activité polyméthylgalacturonase ce qui se traduit en particulier, sur substrat de pectine à pH 4,0 par une vitesse de rupture des liaisons glucosidiques plus élevée que la vitesse de déméthoxylation, alors que dans les anciennes préparations, ces vitesses apparaissaient souvent du même ordre de grandeur, témoignant alors de l'interdépendance absolue des activités polygalacturonase et pectine estérase.

3° Pour une même préparation, le rapport des activités définies par viscosimétrie à celles définies par la vitesse de rupture, des liaisons glucosidiques est considérablement accru, témoignant ainsi d'une recherche des activités du type *endo* (*endo*-PG et *endo*-PMG).

Équipement du raisin en enzymes pectolytiques.

L'apport du raisin en enzymes pectolytiques, responsable en particulier du processus naturel de la clarification, nous semble trop souvent négligé.

A notre connaissance, aucune étude biochimique approfondie n'a encore été consacrée à la purification et à l'étude des propriétés spécifiques des deux types d'activité qui ont été caractérisés, (Flanzy et Bouzigue, 1958; Marteau, Scheur, Olivieri 1961-1963; Usseglio Tomasset, Tarantola, 1963).

Il s'agit :

— d'une PE, de concentration très variable, mais toujours relativement élevée par rapport à l'activité correspondante susceptible d'être introduite lors d'un traitement par une préparation commerciale ;

— d'une activité de type *endo*-PG, susceptible d'abaisser la viscosité d'une solution de pectine ; cette dernière activité qui croît considérablement en cours de maturation, demeure généralement plus faible que celle introduite par addition d'une préparation commerciale aux doses normales d'emploi.

Nous avons montré (1963) que, paradoxalement, c'est cette dernière activité, dont tout laisse penser qu'elle constitue un facteur limitant, et non pas l'activité PE, qui règle la vitesse de libération du méthanol dans le moût fraîchement extrait. Intervient-il dans ce dernier, vis-à-vis de la PE, un phénomène d'inhibition par des bsta nces polyphénoliques, selon un processus souvent signalé dans d'autres milieux

tels que la banane ? (Swardt, Maxie, 1967). Nous n'avons pourtant jamais constaté une accélération de la libération du méthanol, après une addition de polyvinylpyrrolidone condensé ou de gélatine.

Par contre, l'observation très ancienne de Lineweaver et Ballou (1945), selon laquelle les formes déméthoxylées libres d'acide polygalacturonique, bloqueraient, selon un mécanisme de rétro-inhibition, la poursuite de la libération du méthanol par la PE, rend beaucoup mieux compte de l'ensemble des faits expérimentaux. Cette observation que tendraient à confirmer les travaux récents de Lee et Mac Millan (1968) sur la PE purifiée de la tomate, explique notamment qu'au bas pH du moût de raisin, la vitesse de libération du méthanol dépende essentiellement de la dégradation ultérieure des formes déméthoxylée de pectine et donc de l'activité PG qui apparaît bien comme un facteur limitant.

Action conjuguée des enzymes du fruit et des enzymes exogènes.

L'efficacité, du point de vue technologique, est liée, comme nous le verrons, à la rupture des chaînes polygalacturoniques dont l'abaissement de viscosité du moût ou du vin est la conséquence la plus immédiate. A cet égard, les enzymes du fruit et celles de la préparation additionnent-elles leurs effets ?

TABLEAU 2

		Abaissement de viscosité relative/mn (%)				Vitesse initiale de libération du méthanol (mg/h)			
		Moût chauffé	Moût chauffé enzymé	Moût frais	Moût frais enzymé	Moût chauffé	Moût chauffé enzymé	Moût frais	Moût frais enzymé
14-9-65	1	0,00	0,2	0,03	0,25	0,00	0,62	0,06	0,75
22-9-65	2	—	1,76	0,047	2,0	—	0,10	0,46	0,52
26-8-66	3	—	5,00	0,03	5,2	—			
23-9-71	4	—	0,9	0,9	1,75	—	0,20	0,21	0,43
12-10-71	5	—	0,90	1,33	1,49	—	0,001	1,07	1,07

La connaissance préalable des activités telles que l'on peut les mesurer sur un substrat artificiel de pectine tamponné au pH optimum, ne permet pas, semble-t-il, de prévoir exactement ce qui se passera dans le moût et dans le vin. Nous avions en 1963 comparé des préparations apparemment très pauvres en activité PMG et constaté que leur efficacité technologique les classait en fonction de leur activité PE ; nous avions alors émis l'hypothèse d'une efficacité pouvant être liée à la somme des activités PE du moût et de la préparation ; nous basions notre raisonnement sur l'interdépendance absolue des activités PE et PG telle que la suggèrent les résultats mentionnés plus haut (tabl. 1). La présence en quantité importante, dans les préparations actuelles d'une activité PMG rend ce raisonnement inopérant. Il est vraisemblable que sur des moûts et des vins privés par chauffage de leurs enzymes naturelles cette dernière activité joue un rôle déterminant, tout comme l'avait constaté pour

le jus de pomme SCHUBERT (1952). Sur les moûts et les vins non chauffés, la PE du raisin doit logiquement valoriser, par contre, l'activité *endo*-PG des préparations.

Si maintenant, nous prenons en considération non pas les activités mesurées sur substrat artificiel, mais directement les effets de ces activités sur le moût ou sur le vin, l'additivité des activités du moût et de la préparation, sans être parfaite, se vérifie cependant beaucoup mieux. C'est ce que montre le tableau 2, dans les conditions variées qui témoignent en particulier de la très grande variabilité de la participation des enzymes du raisin à la pectolyse.

Si l'on compare en effet, les vitesses d'abaissement de viscosité relative, respectivement dans le moût frais initial, dans le même moût chauffé à 80°C pendant quelques minutes pour détruire son activité naturelle, puis additionné d'une quantité donnée de préparation et enfin dans le même moût frais, enzymé dans les mêmes conditions, la valeur mesurée dans ce dernier cas, se rapproche généralement assez correctement, de la somme des valeurs obtenues dans les deux premiers. Il en est de même en ce qui concerne la vitesse de libération du méthanol.

Lorsqu'il s'agit par conséquent de juger de l'opportunité d'un traitement ou de fixer une dose de préparation à utiliser, il semble bien préférable d'effectuer des essais préalables directement sur le vin ou sur le moût, plutôt que d'exploiter la connaissance des activités mesurées dans les conditions classiques.

Cela justifie sans doute que les préparations soient étalonnées souvent, en fonction de leur action sur un substrat naturel constitué par exemple par du jus de pomme stabilisé par la chaleur, substrat qui a l'inconvénient cependant de n'être pas reproductible.

La nécessité d'une normalisation plus généralisée des préparations du point de vue de leur efficacité, pourrait conduire, en vue des applications œnologiques, à définir dans ce cas un substrat artificiel et donc reproductible, se rapprochant le plus possible de la composition du moût ou du vin.

Le problème du méthanol.

La crainte d'un enrichissement en méthanol des liquides traités par les enzymes pectolytiques, n'est sans doute pas étrangère aux réticences manifestées parfois vis-à-vis de l'emploi de ces dernières. Nous venons pourtant de souligner l'importance de l'activité PE naturelle du moût, très supérieure généralement à l'activité PE introduite par les préparations commerciales actuelles à leur dose normale d'emploi.

Nous pensons avoir montré (MARTEAU, SCHEUR, OLIVIERI, 1961) que dans les conditions habituelles, lorsqu'une préparation est ajoutée au moût, elle ne fait qu'accélérer la vitesse de libération du méthanol, sans modifier la dose finalement atteinte par rapport à celle résultant de l'action des seules enzymes naturelles du moût ; la dose maxima de méthanol libérable, ne dépend alors que du stock de pectine solubilisée dans le moût au moment de son extraction.

Dans l'immense majorité des très nombreux cas que nous avons observés, la fermentation alcoolique ne modifie pas ce taux potentiel de méthanol libérable, si bien qu'une fois l'équilibre final atteint, les vins issus de moût enzymé ont le même taux de méthanol que les vins issus des moûts non enzymés.

Lorsque le moût ou le vin subissent un traitement thermique suffisant à un stade déterminé de la vinification, le processus de libération du méthanol est interrompu ; lorsque le chauffage est très précoce, ce qui est le cas de la thermovinifica-

tion, cette interruption est également accompagnée du blocage de la clarification.

L'addition postérieure au chauffage, d'une préparation enzymatique, remet le mécanisme en route jusqu'à ce que soit atteinte la même limite que dans le vin issu du moût non chauffé.

C'est alors, en l'absence de la PE naturelle, que la plus ou moins grande richesse en PE de la préparation utilisée peut rendre plus ou moins rapide la libération du méthanol ; on peut même concevoir qu'une préparation caractérisée par une valeur particulièrement élevée du rapport des activités $\frac{PMG}{PE}$, puisse, tout en assurant l'objectif de clarification, conduire à une libération extrêmement lente, si ce n'est pratiquement nulle du méthanol.

Il a en effet été montré (McDonnel et coll., 1958), que la PE fongique pouvait encore déméthoxyler le méthyl-D-galacturonate, mais à une vitesse de seulement 0,2 p. 100 à 0,54 p. 100 de la vitesse de désestérification de la pectine condensée.

Le tableau 3 illustre bien ces données :

TABLEAU 3

		Méthanol libéré mg/l	
		Après 2 jours	Après 40 jours
Moût frais	Témoin	40	40
	+ préparation A	41	40
	+ préparation B	40	41
	+ préparation C	40	40
Moût chauffé	Témoin	10	12
	+ préparation A	11	24
	+ préparation B	15	40,5
	+ préparation C	12,5	41,0

La préparation A, relativement pauvre en PE, par rapport à son aptitude à abaisser la viscosité d'une solution de pectine, utilisée sur moût frais à sa dose normale d'emploi, libère à la même vitesse que le témoin, le même taux final de méthanol.

Sur le moût chauffé, deux préparations B et C conduisent, après 40 jours, au même taux limite que le moût frais, tandis que la préparation A est encore loin d'avoir atteint ce taux limite.

Le problème se pose tout à fait différemment lorsque les préparations enzymatiques sont ajoutées à la vendange entière. Du fait même de l'activité protopectinase qui est alors exploitée, la dissolution de pectine qui en résulte accroît donc d'autant le potentiel de méthanol libérable. Nous avons déjà souligné à maintes reprises que l'accroissement du taux de méthanol limite, résultant de la macération, pouvait constituer une méthode valable d'appréciation de l'activité protopectinase. L'accroissement de cette activité sous l'influence de la macération conduit donc inévitablement à un accroissement du taux limite de méthanol, dont il faut souligner cependant

qu'il demeure, dans les cas où les traitements enzymatiques sont les plus justifiés (vinification en vin de café, thermovinification) très inférieur au taux de méthanol atteint dans les vins rouges obtenus selon la méthode traditionnelle. Nous reviendrons plus loin sur ce problème.

Les applications œnologiques des enzymes pectolytiques.

1. *Utilisation des enzymes en vue d'une meilleure extraction du moût ou du vin.*

C'est dans ce cas, très précocement, que la préparation enzymatique est ajoutée à la vendange foulée. Le substrat attaqué est constitué par les formes insolubles de pectine contenues dans les parois cellulaires dont l'aptitude à pouvoir donner naissance à des formes solubles est à la base même de la définition de la protopectine. En présence d'un substrat aussi peu défini, il n'est pas étonnant que l'existence d'une protopectinase spécifique soit encore controversée.

Le fait que la protopectine soit constituée par des chaînes pectiques particulièrement condensées, peut laisser supposer que les activités *endo*-PG et *endo*-PMG, soient pour la plus grande part responsables de l'activité protopectinase. Cependant, dans les parois cellulaires, les chaînes polygalacturoniques sont associées à des composants non pectiques cellulosiques ou hémicellulosiques notamment.

Outre l'acide galacturonique, d'autres oses tels que l'arabinose, le xylose, le galactose sont rencontrés dans les produits finaux de l'hydrolyse des pectines (Reid, 1950). Il n'est donc pas impossible que d'autres enzymes que les enzymes pectolytiques, témoignant d'activité cellulase, xylanase, etc. figurant dans les préparations puissent participer d'une façon appréciable à l'activité globale protopectinase. Si la réalité biochimique de cette dernière en tant qu'activité spécifique est donc douteuse, elle a, par contre, une réalité technologique incontestable.

La dégradation des parois cellulaires résultant de cette activité globale facilite évidemment la libération du suc vacuolaire qui donne naissance au moût.

De très nombreuses publications confirment cette action qui est maintenant trop bien connue pour que nous nous y arrêtions longtemps.

Les quelques conclusions à rappeler concernant la pratique œnologique, sont les suivantes :

— Le rendement en moût et en vin est accru dans une proportion pouvant dépasser 10 p. 100, qui dépend beaucoup de la nature du cépage ; mais cet accroissement peut être considérable lorsque les raisins sont très pulpeux (par exemple certains hybrides), ou très riches en sucre (par exemple muscat).

Notons que cet accroissement de rendement se manifeste surtout sur la fraction du liquide la plus immédiatement extractible (goutte et première presse).

Le traitement enzymatique peut donc être un facteur notable d'amélioration de la qualité des vins dans la mesure où plutôt qu'une augmentation de rendement, le vinificateur, pour un rendement donné, est en mesure d'accroître la qualité du vin produit grâce à une diminution des contraintes mécaniques imposées à la matière première.

Outre l'accroissement de rendement, des effets secondaires peuvent résulter du traitement.

Comparativement à un témoin traité dans les mêmes conditions de macération et de température, certains auteurs observent un accroissement de la coloration des

vins rouges (Fernandez et Hernandez, 1963), d'autres (Blouin et Barthe, 1963) ne constatent pas d'effet déterminant de ce point de vue ou même une diminution de la couleur des échantillons issus de vendange traitée. En fait, ces divergences peuvent fort bien s'expliquer en raison des nombreux facteurs qui peuvent influer sur la couleur des vins au cours de leur conservation. A chaque instant cette coloration résulte de l'équilibre entre le stock d'anthocyanes arrachées des pellicules que l'action des enzymes vis-à-vis des parois cellulaires doit logiquement accroître et des pertes considérables intervenant au cours de la fermentation puis de la conservation des vins par hydrolyse et condensation des hétérosides anthocyaniques. Il est certain que cette dernière phase est accélérée par les enzymes pectolytiques car elle est en partie liée au processus même de la clarification. Les échantillons traités atteignent donc plus vite la période caractérisée par une certaine stabilité de la couleur, ce qui constitue un avantage technologique. C'est au moment où cette stabilité est atteinte que l'on doit tirer des conclusions relatives à l'influence globale du traitement sur l'intensité colorante qui, en fonction de nos récentes observations, nous a paru assez favorable.

En ce qui concerne l'influence sur les qualités organoleptiques des échantillons traités, si certains auteurs (Blouin et Barthe, 1963) ne décèlent aucune influence déterminante, d'autres au contraire soulignent à la fois l'acquisition plus rapide d'un certain mûrissement des vins, une exaltation des arômes tel celui du muscat (Kischovsky et coll., 1966, Abourazakova et coll., 1966).

Des auteurs soviétiques (Fornitcheva et coll., 1968) attribuent, en partie, l'amélioration du goût des échantillons traités à la disparition de l'hexanal et de l'hexanol responsables du goût herbacé ; il est cependant vraisemblable que cette action est indépendante de l'équipement pectolytique proprement dit des préparations.

Quels sont les types de vinification les plus justiciables d'un traitement éventuel réalisé sur la vendange foulée ?

L'effet recherché dépend évidemment beaucoup de la durée de la macération ; la dose d'emploi de la préparation nécessaire en vue d'un effet technologique donné, conditionne la rentabilité de l'opération. La limitation de la durée de macération qu'imposent les techniques classiques d'obtention des vins rosés et surtout des vins blancs, nécessite donc des doses nettement accrues. Il y a donc un équilibre à rechercher, particulièrement difficile à atteindre pour ces derniers vins dont la qualité est généralement diminuée lorsqu'un contact même très limité entre les matières solides du raisin et le moût, dissout dans ce dernier des substances nuisibles tels les composés phénoliques précurseurs du brunissement. A l'inverse, les vins rouges obtenus selon le procédé classique, subissent une très longue macération au contact des matières solides ; ils peuvent être enzymés à faible dose et donc économiquement. Cependant, l'intérêt de l'opération du point de vue de l'extraction du jus est alors nettement dévalué car les vins sont extraits de la masse fermentée, beaucoup plus facilement que les moûts ne le sont de la vendange fraîche.

Les effets secondaires évoqués plus haut ainsi que les objectifs de clarification que nous verrons plus loin, constitueront alors davantage la justification d'un éventuel traitement. Plaçons-nous maintenant dans une optique plus moderne de l'œnologie basée sur la nécessité d'offrir au vinificateur des moyens accrus de contrôle des

phénomènes d'échange entre moût et matières solides. L'apparition récente de techniques telles que la thermovinification peuvent rendre ces derniers indépendants de la fermentation dont le contrôle peut être pour sa part, mieux assuré en phase liquide. Il est possible maintenant, grâce à l'équipement moderne, de concevoir selon les cas, des durées de macération strictement définies, variant par exemple de 2 heures à 12 heures à froid, de 15 minutes à 30 minutes à chaud, permettant ainsi d'obtenir à partir de la même matière première, toute la gamme des vins possibles entre les vins rosés et les vins rouges.

De telles conditions sont idéales pour exploiter éventuellement au mieux les effets favorables des enzymes pectolytiques, dont la dose peut être dès lors parfaitement adaptée à l'objectif recherché.

TABLEAU 4

		Rendement vendange (%)				Méthanol après 2 mois (mg/l)		Méthanol limite (vin) mg/l	Intensité colorante vins après 2mois
		goutte	1re presse	2e presse	total	moût	vin		
I	Témoin ...	42,3	29,6	8,6	80,5	80	77	83	0,140
	enzymé ...	47,1	31,4	5,7	84,2	100	103	105	0,180
II	Témoin ...	49,2	22,8	—	72	27	38,4	55,7	0,135
	enzymé ...	48,5	27,3	—	75,8	53	59,7	68,0	0,230

I — Vinification comportant une macération de 12 heures à température ordinaire.
II — Vinification par macération à chaud (55°, 30 minutes).

Le tableau 4 fournit les données relatives à deux exemples choisis dans ce domaine, comportant les traitements enzymatiques modérés, pratiqués lors de la dernière campagne. Les conclusions sont conformes à celles que nous avons déjà maintes fois exprimées.

TABLEAU 5

	Méthanol (mg/l)		Couleurs		Clarification après 1 mois
	Après 2 mois	Limite	Intensité	Nuance	
Vinification classique	168,0	182	0,51	0,50	limpide
Thermovinification-vinification					
Vin témoin	36,4	70,6	0,65	0,47	trouble
Vin issu du moût enzymé.	48,9	68,5	0,69	0,47	limpide

Le tableau 5 comparant à la vinification en rouge classique la vinification par macération à chaud (70°, 30 minutes) avec ou sans addition d'enzyme au moût, avant fermentation, montre bien que l'association de la macération à chaud et de l'enzymage du moût obtenu, aboutit à un vin rouge plus coloré que celui obtenu selon la méthode traditionnelle, aussi rapidement clarifié que ce dernier, mais beaucoup moins riche en méthanol.

N'oublions pas, pour achever ce chapitre, que les moûts extraits de la matière première enzymée, contiennent la plus grande partie des enzymes incorporées dans cette dernière, qui peuvent dès lors jouer un rôle dans la phase de clarification que nous allons évoquer maintenant.

2. *Utilisation des enzymes en vue de la clarification.*

D'une façon très schématique, le mécanisme de la clarification du moût ou du vin, tel qu'il ressort des faits expérimentaux (Marteau, 1967), se déroule en trois phases, selon un processus dont tout semble montrer qu'il est très voisin de celui évoqué par Endo (1965) à propos du jus de pomme, sous l'action conjuguée de plusieurs des enzymes hautement purifiées par cet auteur à partir d'une préparation fongique.

Au cours de la première phase, que nous appellerons « phase enzymatique », intervient jusqu'à un certain stade l'hydrolyse des pectines solubilisées dans le moût ; cette hydrolyse qui peut être, nous l'avons vu, attribuée aussi bien aux enzymes du fruit qu'aux enzymes exogènes, s'accompagne, dans un premier temps, d'un abaissement de viscosité, d'abord rapide puis plus lent, jusqu'à une valeur limite qui, soulignons-le, ne nécessite que la rupture d'un nombre très réduit de liaisons glucosidique (5 p. 100 à 10 p. 100). Il est donc évident qu'à ce stade, les enzymes du type « *endo* » (*endo*-PG et *endo*-PMG), jouent un rôle prédominant, Tant que la viscosité n'a pas atteint une valeur proche de sa valeur limite, la pectine en solution joue le rôle de colloïde protecteur et empêche le mécanisme physico-chimique de floculation qui conditionne la clarification. Une addition très précoce (fig. 2) de pectine de pomme par exemple, à du moût de raisin, retarde la floculation du temps nécessaire pour atteindre la viscosité critique. C'est dire que le délai de clarification qui peut varier dans des proportions très considérables (quelques heures à quelques semaines), dépend non seulement de la quantité de pectine solubilisée dans le moût mais encore et surtout de l'activité enzymatique naturelle ou surajoutée contenue dans ce dernier.

La deuxième phase, non enzymatique, de la clarification correspond à la manifestation souvent très rapide, de ce que nous appelons la floculation clarifiante, dont le mécanisme semble s'apparenter à un véritable collage naturel où les protéines natives du moût jouent un rôle prédominant, puisque le floculat obtenu contient environ le 1/3 de son poids sec de matières azotées sous forme protéique. Tout comme dans le jus de pomme selon Yamasaki, Yasui et Arima (1964), il est vraisemblable qu'une part importante de ce mécanisme résulte de l'opposition des charges entre les particules du trouble chargées négativement et les protéines positivement chargées au pH du vin.

La troisième phase est, enfin, la phase de sédimentation dont la vitesse peut être en première approximation définie par la loi de Stokes et dépend donc essentiellement de la réalisation de la phase précédente.

Une question importante se pose : le mécanisme ainsi mis en évidence sur le moût de raisin est-il applicable au vin ? Autrement dit, la clarification de ce dernier résulte-t-elle d'un mécanisme tout à fait à part, ou bien est-elle simplement un prolongement de ce qui se passe dans le moût ?

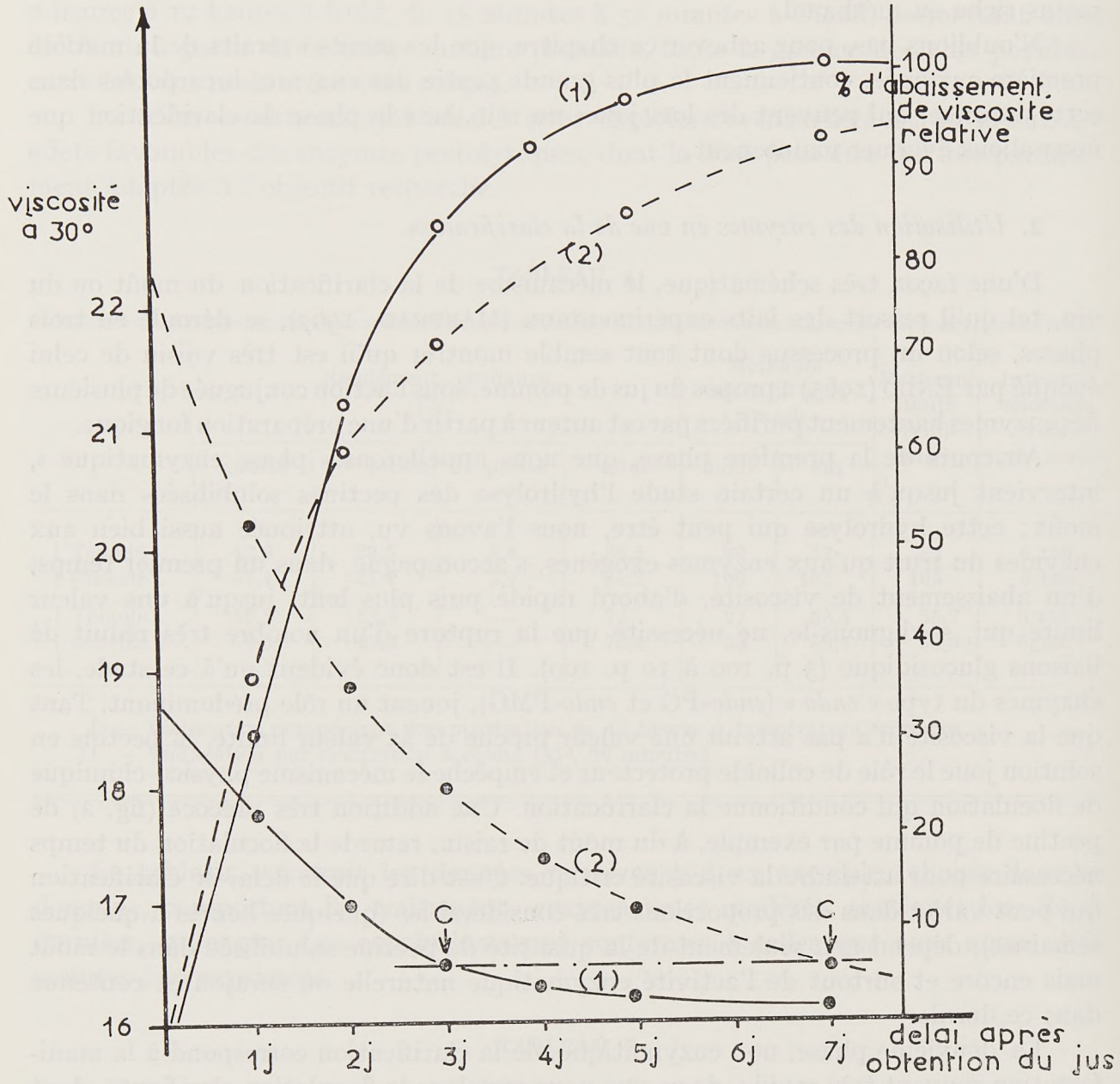


Fig. 2. — *Abaissement de viscosité et clarification du jus de raisin, influence d'une addition de pectine*

(1) —— Jus naturel.
(2) ---- Jus + pectine de pomme (0,5 g/l).
• Viscosité à 30°C (exprimée par le temps de chute d'une bille de verre d'un viscosimètre de Höppler).
○ P. 100 d'abaissement de viscosité relative.

Nous avons déjà eu l'occasion de signaler (1967) qu'il existait beaucoup d'arguments en faveur de cette dernière affirmation, malgré notamment la modification du potentiel enzymatique du milieu qui accompagne la fermentation et qui se traduit, par rapport au moût, par une diminution très nette de l'activité PE et, par

contre par un accroisement de l'activité ou des activités responsables de l'abaissement de viscosité de la pectine.

C'est ainsi qu'un moût de clarification rapide donne généralement un vin également rapidement clarifiable, dont la centrifugation, même en cours de fermentation, fournit un liquide limpide. De même, un moût de clarification lente, donne un vin de clarification lente, ne donnant que très tardivement un liquide limpide après centrifugation. L'addition, quelques semaines après son obtention, de pectine de pomme à du moût ou au vin correspondant, donne lieu, dans ces liquides, à une libération de méthanol et à un abaissement de viscosité, d'autant plus rapide que la clarification liée à ces phénomènes avait été rapide dans les moûts fraîchement obtenus. De toute façon, des études plus approndies seront nécessaires pour relier et le comportement du vin, à la modification du potentiel enzymatique dont il est l'objet et pour déterminer à cet égard le rôle éventuellement joué par une activité polygalacturonique excrétée par les levures.

Quelles sont, dans ces conditions, les circonstances pouvant justifier un traitement enzymatique ?

1. En ce qui concerne le traitement des moûts, un premier objectif recherché peut consister à prévenir une difficulté ultérieure de clarification des vins, lorsque celle-ci est prévisible. Compte tenu de l'identité de comportement du vin et du moût correspondant, un test préalable consistant par exemple à étudier la variation de viscosité du moût intervenue en 12 heures, peut donner une idée valable du délai de clarification. Le traitement sera particulièrement justifié lorsque des impératifs économiques peuvent conduire à justifier une commercialisation précoce du vin.

Les moûts issus de vendange chauffée à haute température, au-dessus de 60°-65° et donc privés de leur potentiel enzymatique naturel, pourront être avantageusement traités de la sorte (tabl. 5).

Dans le cas particulier de la vinification en blanc ou en rosé, une utilisation plus systématique des préparations pectolytiques peut être faite en vue d'une accélération du débourbage, permettant une mise en fermentation d'un moût limpide et donc en particulier débarrassé d'une part importante des oxydo-réductases liées aux particules constitutives du trouble et donc séparées avec les bourbes.

2. Lorsqu'il s'agit des vins dont le traitement peut être envisagé en cours de conservation parce que rebelles à la clarification naturelle, nous pensons qu'il est logique de subordonner le traitement à la caractérisation préalable de celle des trois phases de la clarification qui apparaît concernée :

a) Une clarification obtenue au laboratoire par simple centrifugation, dans des conditions standardisées, met en cause la phase de sédimentation. Le traitement enzymatique n'est généralement pas justifié dans ce cas, qui est davantage du ressort de la centrifugation ou de la filtration.

b) Une clarification obtenue au laboratoire comme suite à un simple essai de collage, met généralement en cause la deuxième phase non enzymatique, de la clarification ; elle n'implique donc pas *a priori* une addition d'enzyme que peut cependant parfois justifier une filtration complémentaire.

c) Par contre, l'absence de clarification après ces deux essais préliminaires, peut mettre directement en cause la première phase enzymatique de la clarification.

Dans ce cas, un essai préliminaire comportant une addition d'enzymes, confirme éventuellement l'hypothèse et justifie un traitement.

Il arrive souvent cependant, que les deux premières phases enzymatique et non enzymatique, soient à la fois perturbées ; c'est notamment fréquemment le cas, des vins issus de vendange ou de moût portés à températures supérieures à 70°. Dans ce cas, un traitement enzymatique suivi d'une addition à faible dose, faite après un délai suffisant, d'une colle protéique telle que la gélatine, donne généralement de bons résultats.

3. *Utilisation des enzymes en vue de faciliter la filtration.*

Les enzymes pectolytiques ont été parfois appelées « enzymes de filtration », ce qui témoigne de leur aptitude générale à améliorer la vitesse de filtration des moûts et des vins. La filtration très précoce des moûts, en vue par exemple de l'obtention de vins spéciaux, justifie particulièrement un tel traitement, comme l'ont montré Geoffroy et Perin (1961) dans le cas du champagne et Tarantola (1957) dans le cas de l'Asti Spumente.

Dans la mesure où la dégradation des pectines conduit à un abaissement de la viscosité du milieu, il est logique de penser que la vitesse initiale de la filtration est accrue, puisque l'allure de cette dernière, dans le processus dit par tamisage, est inversement proportionnelle à la viscosité. Mais la variation de viscosité d'un moût ou d'un vin, accompagnant la première phase de l'hydrolyse des pectines est assez réduite, ce n'est donc pas là, le processus essentiel. Par contre, l'action colmatante des formes insuffisamment dégradées de pectines ou d'autres polysaccharides peut être considérable et c'est donc surtout en vue de retarder le colmatage des filtres que l'on envisage l'emploi de préparations enzymatiques.

Notre raisonnement serait mieux étayé dans ce domaine, si nous connaissions le rôle colmatant des résidus pectiques plus ou moins dégradés, dans chacun des deux processus fondamentaux de la filtration que sont le tamisage et l'adsorption. Il est certain que cette action colmatante se poursuit bien après que la dégradation des pectines ait permis d'atteindre la limite inférieure de viscosité.

L'amélioration de la filtrabilité des moûts et des vins peut donc justifier soit des doses plus élevées d'enzymes, soit des temps d'action plus longs, ce qui est tout à fait concevable lorsque la technique s'applique à des vins faits.

Soulignons, par ailleurs, que des polysaccharides autres que les pectines peuvent participer au colmatage des filtres ; c'est notamment le cas lorsque des résidus cellulosiques ou hemicellulosiques se trouvent en plus grande abondance, par suite de l'addition précoce des préparations dans la vendange foulée, faite en vue d'atteindre les objectifs précédemment définis. Il peut même en résulter, sur les vins issus de ce traitement une diminution de la filtrabilité par rapport à un témoin non traité.

Ce fait peut donc justifier, qu'en vue de la filtration, soient employées des préparations dans lesquelles aux enzymes pectolytiques soient associées d'autres activités par exemple du type cellulase ou xylanase.

Très souvent l'emploi des enzymes en vue de la filtration est complété par un collage à la gélatine propre en particulier à éliminer l'action colmatante et le facteur d'instabilité qui constitue les formes polyphénoliques condensées. L'association

synergique du traitement enzymatique et d'un tel collage, donne généralement une amélioration très notable de la filtrabilité.

Le problème des dextranes.

Il arrive assez souvent que des vins issus de vendanges altérées contiennent des quantités appréciables de polysaccharides accidentels issus du métabolisme microbien. C'est notamment le cas des dextranes, encore mal étudiées dans le cas du raisin, qui posent certaines années de très sérieux problèmes de clarification et de filtration, en raison de leur très grand pouvoir colmatant. Des préparations contenant une dextranase encore active au pH du vin, rendrait les plus grands services à l'œnologie.

B. — *L'emploi des protéases en œnologie*

Les matières azotées du moût de raisin fraîchement extrait, contiennent une part relativement importante d'azote protéique, certainement très variable selon le cépage, les conditions de végétation de la vigne, le degré de maturation, le mode d'extraction,... et la méthode de dosage exploitée dont CORDONNIER (1966) a souligné le manque d'unité, cause de nombreuses divergences apparues dans les résultats publiés.

KOCH (1963) a souligné que le traitement de la vendange par les enzymes pectolytiques, entraîne un accroissement du taux de protéines solubles dans le moût. Mais nous avons vu que la dégradation enzymatique ultérieure des pectines solubilisées à partir des parois cellulaires, entraînait la floculation d'une partie importante de ces protéines, lors de la clarification spontanée intervenant avant, pendant ou après la fermentation alcoolique.

Par rapport au moût fraîchement extrait, le taux de protéine du vin est très réduit, notamment dans les vins rouges, riches en tanins qui favorisent le processus de la floculation. Les vins blancs, par contre, possèdent généralement un taux résisuel d'azote protéique plus important qui pose davantage dans leur cas, un problème de stabilité. Ce problème tendra vraisemblablement à s'accentuer, dans la mesure où les techniques de pasteurisation des vins se développeront parallèlement à la limitation, généralement souhaitée, des moyens chimiques de stabilisation biologique.

La déprotéinisation nécessaire, en vue de préserver la limpidité des vins pasteurisés en cours de conditionnement, impose soit un traitement thermique préalable peu favorable à la qualité du vin, soit un traitement par la bentonite qui n'est pas sans inconvénient.

Du point de vue enzymatique, le raisin possède bien un matériel protéolytique (CORDONNIER et DUGAL, 1968) encore très actif au pH du moût et très thermostable puisque encore actif à 70°-80° ; c'est pourquoi sans doute la vinification par macération à chaud fournit des vins particulièrement pauvres en protéines, mais, par contre, enrichis en azote peptidique (CORDONNIER, 1970).

Au cours de la fermentation, l'activité protéase du moût est inhibée par l'alcool formé. Les levures en activité ne peuvent prendre le relai de la protéolyse en raison du caractère intracellulaire des protéases de *Saccharomyces cerevisiae* dont l'activité très importante vis-à-vis de l'autolyse, ne se manifeste pas, par contre, vis-à-vis des protéines du moût en fermentation.

C'est dans ce contexte qu'il faut envisager l'exploitation d'une activité protéase exogène :

Si l'on se réfère à la bière plutôt et plus expressément concernée que le vin par l'éventualité d'un traitement vis-à-vis des troubles protéiques, il semble que la papaïne, seule ou associée à d'autres protéases, soit la plus employée. La très grande stabilité de cette enzyme vis-à-vis de la chaleur, qui se traduit en particulier par la persistance d'une activité résiduelle après la pasteurisation, semble constituer un argument fondamental justifiant son emploi (Reed, 1966).

Le vin, par contre, en raison de son pH voisin de 3, se trouve beaucoup trop éloigné du pH optimum de la papaïne ; c'est sans doute la raison pour laquelle, les investigations actuelles dans ce domaine, fort peu nombreuses d'ailleurs, semblent s'orienter davantage vers l'utilisation des protéases fongiques acides. Ces dernières constituent l'une des trois catégories de protéases (acides, basiques et neutres) que l'on peut extraire des moisissures telles que *A. oryzae* (Bergkvist, 1963) dans une classification arbitrairement basée sur le pH optimum de ces enzymes. Tsakov (1970) fait état des résultats divergents obtenus par divers auteurs après addition de préparations à du moût avant fermentation ou à du vin. Le même auteur aboutit à une stabilité suffisante vis-à-vis des troubles protéiques après l'addition d'une préparation protéasique dans le vin, malgré semble-t-il, la très faible diminution, par rapport au témoin, du taux d'azote protéique dans l'échantillon traité (72 mg/l à 67 mg/l).

Datounaschvili (1970) a expérimenté plusieurs préparations extraites de *Fungus aspergillus* ; de telles préparations ajoutées à un moût permettent en 24 heures, l'hydrolyse des protéines jusqu'à un stade où les produits de dégradation ne précipitent plus par l'acide trichloracétique, tandis que dans les vins, dans les mêmes conditions, et au bout de 48 heures, 29 à 42 p. 100 seulement de l'azote précipitable par l'acide trichloracétique a disparu.

Du point de vue des effets secondaires, le même auteur signale une très importante action vis-à-vis de la couleur des vins, qui est accrue d'une façon considérable lorsque les préparations sont ajoutées à la vendange entière dans les conditions propres à favoriser les objectifs recherchés, par l'exploitation de l'activité protopectinase, ce qui justifierait dans ce cas, d'après Datounaschvili, l'association de protéases aux enzymes pectolytiques.

Pour conclure ce chapitre, disons que les données acquises ne sont pas encore très précises et que des études plus approfondies seront encore nécessaires, faisant appel en particulier à des préparations protéolytiques suffisamment purifiées pour que la spécificité de leur action soit mieux définie et puisse ainsi être mieux exploitée.

Ces conditions étant satisfaites, il est vraisemblable que l'utilisation des protéases en œnologie se trouvera justifiée par rapport aux traitements plus brutaux, actuellement utilisés pour stabiliser les vins vis-à-vis des troubles protéiques.

C. — *L'emploi de la glucose oxydase en œnologie*

L'emploi de la glucose oxydase, devant faire l'objet d'un rapport spécial dans le cadre de ce symposium, je me contenterai ici d'évoquer très rapidement les particularités œnologiques de son emploi éventuel.

Ce dernier, en association bien sûr avec la catalase, est évidemment lié à l'élimination aussi parfaite que possible de l'oxygène dissous, selon les réactions globales :

$$\text{glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{glucose oxydase}} \text{ac. gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 1/2\ O_2 + H_2O$$

De ce fait, un premier objectif peut être recherché dans un but de stabilité biologique des vins, celui d'inhiber le développement des levures de refermentation, particulièrement dangereuses dans le cas des vins doux ; l'absence totale d'oxygène dissous permet d'atteindre ce but comme l'a constaté Lambion (1963), dans une expérience comportant un ensemencement à raison de 5 000 cellules vivantes par ml. Évidemment, l'élimination totale de l'oxygène empêche le développement des bactéries acétiques et protège donc les vins vis-à-vis du développement accidentel de l'acidité volatile ; c'est ce qu'à montré Yang (1955) dans une expérience faite sur le cidre.

Le plus souvent, l'utilisation de la glucose oxydase a été envisagée en vue de prévenir les effets nuisibles de l'oxygène vis-à-vis de la couleur et du goût des vins. Dans une étude très récente, Mc Leod et Ough (1970) ont mis en évidence l'influence de quelques facteurs sur l'efficacité du procédé : la quantité de glucose contenue dans les vins, conditionne la vitesse d'élimination de l'oxygène ; pour que la dose résiduelle de ce dernier tombe en 72 heures, au-dessous de 1 ml/l, la dose de sucres réducteurs doit se situer au-dessus de 1 p. 100. Au-dessous de 1 ml/l d'oxygène, l'élimination de ce dernier devient évidemment très lente ; l'action inhibitrice du SO_2 vis-à-vis de la glucose oxydase a été signalée par Merjanian et Tagounkov ; même des doses dépassant les valeurs couramment exploitées, n'empêchent pas l'action de la glucose oxydase, mais retardent simplement de quelques heures le début de la consommation d'oxygène.

Le pyrocarbonate de diéthyle n'a pas, vis-à-vis de la glucose oxydase, le même effet inhibiteur que vis-à-vis d'autres déshydrogénases ; aux doses courantes d'emploi, lorsqu'il est autorisé, il ne retarde pas la consommation d'oxygène.

L'obligation d'associer la glucose oxydase à la catalase, en vue d'éliminer les effets oxydants de l'eau oxygénée, pose le problème de la stabilité de ces deux enzymes. Dans un vin de composition moyenne, la glucose oxydase disparaîtrait en 8 jours environ ; selon des travaux récents cités par Mc Leod et Ough, la catalase serait détruite plus rapidement encore. Tout nouveau contact avec l'oxygène, quelques jours après le traitement, risque donc de causer des accidents très graves au vin lorsque la glucose oxydase manifeste encore une activité en l'absence de catalase. L'oxydation de l'alcool en acétaldéhyde par l'eau oxygénée accumulée est particulièrement à craindre dans ce cas. La nécessité absolue de mettre le vin à l'abri de l'air dès après le traitement, pose certainement un problème au niveau du conditionnement et du bouchage.

Nous savons par ailleurs, d'après en particulier les travaux de J. Ribéreau-Gayon (1961), que dans le moût et dans le vin, l'oxygène dissous est plus ou moins rapidement consommé pour entrer dans des combinaisons constituant des oxydants intermédiaires. Ce phénomène intervient très rapidement dans les moûts où ces oxydants intermédiaires sont surtout représentés par les quinones résultant de

l'oxydation des polyphénols, elle-même catalysée par les oxydo-réductases naturelles (polyphénol-oxydase et peroxydase). Un phénomène de ce type intervient également dans le vin où selon Ribéreau-Gayon l'oxygène dissous est consommé à 20°C dans un délai d'environ 15 jours, le rôle catalytique étant alors assuré surtout par les métaux lourds ; vis-à-vis de cet oxygène, fixé dans des combinaisons qui lui confèrent une grande réactivité, la glucose oxydase ne peut plus rien.

L'ensemble de ces données limite donc le champ d'utilisation de ce traitement qui apparaît de ce fait plus restreint que ce que l'on peut logiquement attendre du développement actuel des techniques de mise sous gaz inerte (azote, gaz carbonique), dont la mise en œuvre assez coûteuse cependant, peut logiquement intervenir à tous les stades de la vinification.

Il n'en demeure pas moins que l'emploi de la glucose oxydase, raisonné en tenant compte des facteurs que nous venons d'évoquer, compte tenu aussi de la tendance actuelle à diminuer les doses de SO_2, peut conduire à une amélioration notable de la qualité organoleptique des vins traités, en diminuant leur « caractère oxydé », notamment du point de vue de leur couleur (Mc Leod et Ough, 1970).

SUMMARY

UTILIZATION OF ENZYMES IN ŒNOLOGY

Having studied to what extent the oenologic use of enzymes is conform to the doctrinal idea of genuine wine, the author is considering some possible applications. The use of pectolytic enzymes with the view to facilitate the extraction, the clarification or the filtration of wort or wine, must be well throught in function of the proper enzymatic outfit of the grapes.

Can be also considered the use of proteases in the intention to prevent the proteic troubles, or the glucose-oxydase associated to the catalase in order to prevent the oxydative prejudicial transformations.

ZUSAMMENFASSUNG

VERWENDUNG VON ENZYMEN IN ÖNOLOGIE

Nachdem untersucht wurde, in welchem Umfang die œnologische Enzymanwendung konform mit dem doktrinären Begriff des natürlichen Weins ist, sieht der Verfasser einige mögliche Anwendungen vor : Die Benutzung pectolytischer Enzyme zum Zweck von Extraction, Klärung oder Filtration der Würze oder des Weins muss gemäss der der Traube eigenen Enzymbeschaffenheit vorgenommen werden.

Man kann auch die Proteaseanwendung ins Augefassen, um die Proteintrubel zu meiden oder die Anwendung der Glucose-oxydase, verbunden mit der Katalase, um die oxydativen, schädlichen Wirkungen zu verhindern.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abourazakova S., Levtchenko T., Formitcheva T., Sa Fonova L., Kameniet A., 1966. *Vinode Vinograd. S. S. S. R.*, **1**, 47-49.

Albersheim P., Neukom H., Deuel H., 1960 *b*. *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1422-6.

Bergkvist, 1963. *Acad. Chem. Scand.*, **17**, 1521-40.

Blouin J., Barthe J.-C., 1963. *Ind. alim. et agric.*, **12**, 1169-79.

CORDONNIER R., 1966. *Bull. Off. int. Vigne et Vin*, **430**, 1476-89.
CORDONNIER R., 1970. *Bull. Off. int. Vigne et Vin*, **468**, 139-45.
CORDONNIER R., DUGAL A., 1968. *Ann. Techn. agric.*, **17**, 189-206.
DATOUNACHVILI E. N., 1967. *Traudy Vses naoutchno-issledov. Inst. Vinod. Vinograd. Magaratch. S. S. S. R.* **15**, 115-118.
DATOUNACHVILI E. N., 1970. *Bull. Off. inter. Vigne et Vin*, **470**, 377-88.
DEMAIN A. L., PHAFF H. J., 1957. *Wallerstein Lab. comm.*, **20**, 119-40.
MC DONNEL L. R., YANG E. F., JANSEN, LINEWEAVER, 1950. *Arch. Biochem.*, **28**, 260.
ENDO A., 1965. *Agr. Biol. Chem. Japan*, **29**, 222-33.
FERNANDEZ F., HERNANDEZ A., 1963. *Bull. Départ. des Fruits et Vigne*, Univers. Cathol. Chili, mai.
FLANZY M., BOUZIGUES Mme L., 1959. *Ann. Techn. agric.*, **8**, 55-59.
FOMITCHEVA T. M., ABDOURAZAKOVA S., PISSARNITZKY A. F., 1968. *Vinod. i Vinograd S. S. S. R.*, **6**, 7-9.
GEOFFROY P., PÉRIN P., 1961. *Le Vigneron champenois*, **82**, 127.
KISCHOVSKY Z., SAKHAROVA T., KOSSOBOUDSKAYA T., MEKHAUZLA N., MOISSENKO D., 1966. *Vinod. i Vinograd. S. S. S. R.*, **2**, 19-23.
KOCH J., 1963. *Ann. Techn. agric.*, **12**, 297-313.
LAMBION R., 1963. *Ann. Techn. agric.*, **12**, 27-40.
LEE M., MAC MILLAND J. D., 1968. *Biochemistry*, **7**, 4005-4010.
MC LEOD R., OUGHC S., 1970. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **2**, 54-60.
LINEWEAVER H., BALLOU C. A., 1945. *Arch. Biochem.*, **3**, 373-87.
MARTEAU G., SCHEUR J., OLIVIERI C., 1961. *Ann. Techn. agric.*, **10** (2), 161-83.
MARTEAU G., SCHEUR J., OLIVIERI C., 1963. *Ann. Techn. agric.*, **12**, 155-76.
MARTEAU G., 1967. *Ann. Nutrit. et Alim.*, **21**, (5), 223-45.
REID W. W., 1950. *J. Food Agr.*, **1**, 234.
REED G., 1966. *Enzymes in food processing*, Academic Press, p. 340.
RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1961. *Traité d'Œnologie*, Béranger, Paris, t. II.
SCHUBERT E., 1952. *Nature*, **169**, 931-2.
SWARDT, MAXIE, 1967. *J. Agric., Sci.*, S. Afr., **10**, 501-6.
TARANTOLA C., 1957. *Riv. Vitic. enol.*,
TSAKOV D., 1970. *Bull. Off. int. Vigne et Vin*, **470**, 389-401.
USSEGLIO-TOMASSET L., TARANTOLA C., 1963. *Vitis*, **3**, 190-206.
YAMASAKI M., YASUI T., ARIMA K., 1964. *Agr. Biol. Chem. Japan*, **28**, 779-87.
YANG H. Y., 1955. *Food Res.*, **20**, 42-6.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 589-595.

EMPLOI DES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES PECTOLYTIQUES ET DE CELLULASE DANS LA PRODUCTION DES VINS

Dr D. TZAKOV et As. VELITCHKOV

Centre de Recherches scientifiques et de Protection de l'Industrie vinicole
134, Bd du 9-Septembre
Sofia - 18 (Bulgarie)

RÉSUMÉ

Pendant la campagne de 1970 nous avons étudié l'effet de la préparation enzymatique pectolytique d'*Aspergillus niger* avec activité 2 200 PkE/g et de la préparation de cellulase du *Trichoderma viridae* introduites indépendamment et en combinaison 1 : 1.

Les expériences ont été effectuées dans des conditions semi-industrielles dans la cave de l'U. E. E. « Vinprom » à Varna. Nous avons expérimenté les cépages *Rkatzitéli* et *Riesling italien*.

Schéma de l'expérience :

Variante I. — Introduction dans la vendange de la préparation enzymatique 0,05 p. 100.
Variante II. — Introduction de la préparation de cellulase 0,05 p. 100.
Variante III. — Introduction de la préparation enzymatique pectolytique de cellulase.
Variante IV. — Échantillon sans introduction de la préparation enzymatique.

Nous avons procédé aux opérations suivantes :

Foulage de la vendange par fouloir ; sulfitage du *Rkatzitéli* à 10 g SO_2 par 100 kg ; sulfitage du *Riesling italien* à 25 g SO_2 par 100 kg.

La durée de l'action de la préparation a été 4 heures, la température + 10°C.

Les conclusions suivantes ont été tirées :

1° Le plus haut rendement de moût a été obtenu par l'introduction des deux préparations en association. En deuxième rang vient la préparation pectolytique introduite séparément. La préparation de cellulase reste sans effet.

2° L'activité pectolytique dans le moût après le traitement est la plus élevée pour la variante I. Moins élevée pour la variante III. L'activité de la cellulase n'est pas mesurée faute de méthode appropriée.

L'activité pectolytique est plus élevée dans le moût de goutte que dans le moût de presse.

L'activité est plus grande au moment de l'introduction de la préparation. Puis elle diminue jusqu'au démarrage de la fermentation alcoolique.

INTRODUCTION

Au cours de ces années un grand nombre d'essais furent menés sur la possibilité d'emploi des enzymes pectolytiques dans la production des vins. Ainsi, nous sommes parvenus à élucider certains aspects théoriques et pratiques de leur application.

L'utilisation des enzymes considérés se traduit surtout par une augmentation du rendement, une amélioration du pouvoir filtrant, de la coloration et de l'arôme du vin.

Néanmoins, il reste encore un grand nombre de questions, concernant l'effet des enzymes, qui ne sont pas encore élucidées comme par exemple le mécanisme de leur action, l'emploi combiné de plusieurs enzymes, etc.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons examiné l'influence des préparations enzymatiques pectolytiques et de cellulase, employées soit séparément, soit conjointement dans le rapport 1 : 1. La préparation enzymatique pectolytique utilisée est obtenue à partir de l'*Aspergillus niger* ; elle présente une activité polygalacturonasique de 16 000 UPc/g (Unité pectolytique/gramme). La préparation de la cellulase est obtenue à partir de *Trichoderma viridae* et présente une activité de C_1 = 446 000 γ glucose/g, C_x = 272 000 γ glucose/g et activité polygalacturonasique de 2 200 UPc/g.

L'activité polygalacturonasique est déterminée par viscosimétrie sur solution aqueuse de 1 p. 100 de pectine de pomme (2). Les résultats concernant l'activité polygalacturonasique résiduelle dans le moût sont présentés seulement en fonction du taux d'abaissement de la viscosité de la solution pectique.

L'activité C_1 de la préparation de cellulase est déterminée sur coton, préalablement dégraissé et soumis au décreusage (cuisson alcaline) (6), suivant la méthode de Rodionova *et al.* (4), tandis que l'activité C_x — sur substrat de carboxylméthylcellulose de production bulgare, suivant la méthode de Chamody-Nelson (1, 2, 5).

L'analyse chimique du moût a été effectuée d'après la méthode S. B. E. (Standard bulgare d'État).

Le travail expérimental a été conduit sur raisin des cépages *Rkatzitéli* et *Riesling italien*, d'après le schéma suivant :

Essai I. — La vendage est additionnée de 0,05 p. 100 de préparation enzymatique ;
Essai II. — La vendange est additionnée de 0,05 p. 100 de préparation de cellulase ;
Essai III. — La vendange est additionnée de 0,05 p. 100 de préparation pectolytique et de cellulase (combinaison des 2 variantes précédentes) ;
Essai IV. — Contrôle — sans addition de préparation.

La vendange a été traitée sans égrappage. Le sulfitage fut réalisé à l'aide de 10 g/100 kg pour le cépage *Rkatzitéli* et 25 g/100 kg pour le cépage *Riesling*.

Tous les lots de vendange ont été traités dans des conditions semi-industrielles. La durée de macération est fixée à 4 h, à la température de 10°C. On a séparé le moût de goutte après 60 mn ; le pressage est fait à trois reprises avec pressoir à vis, durant 30 mn.

RÉSULTATS

La quantité du moût de goutte, de presse et le volume total des deux précédents réunis, pour chaque essai des deux cépages, figure sur le tableau 1.

Comme on peut le voir sur le tableau, le taux maximum d'accroissement de la

TABLEAU I

Rendement-moût

N°	Variantes	Raisin écrasé (kg)	Moût de goutte			Moût de presse			Quantité totale du moût de goutte et de presse		
			kg	rendement (p. 100)	augment. du rendement (p. 100)	kg	rendement (p. 100)	augment. du rendement (p. 100)	kg	rendement (p. 100)	augment. du rendement (p. 100)
	Cépage *Rkatzitéli*										
1	I. avec 0,05 p. 100 prép. pect.	495,0	288,0	58,2	3,0	74,0	15,0	0,4	362,0	73,2	3,4
2	II. avec 0,05 p. 100 cellulase .	492,0	281,0	57,1	1,9	87,0	17,7	3,1	368,0	74,8	5,0
3	III. combinée	492,0	316,0	64,2	9,0	62,0	12,6	—	378,0	76,8	7,0
4	IV. contrôle sans prép.	500,0	276,0	55,2	0,0	73,0	14,6	0,0	349,0	69,8	0,0
	Cépage *Riesling italien*										
1	I. avec 0,05 p. 100 prép. pect.	408,0	239,0	58,6	1,6	50,6	12,3	—	289,6	70,9	0,4
2	II. avec 0,05 p. 100 cellulase .	409,0	225,0	55,1	—	61,0	14,4	1,4	286,0	69,9	—
3	III. combinée	405,0	224,0	55,1	—	68,0	16,8	3,3	292,0	71,9	1,04
4	IV. contrôle sans prép.	400,0	228,0	57,0	0,0	54,0	13,5	0,0	282,0	70,5	0,0

TABLEAU 2

Composition chimique du moût

N°	Indices	Cépage *Rkatzitéli*				Cépage *Riesling italien*			
		I variante	II variante	III variante	IV variante	I variante	II variante	III variante	IV variante
1	Densité relative à 20°C	1,088	1,089	1,089	1,088	1,083	1,085	1,085	1,084
2	Sucre (%)	20,10	20,50	20,50	20,00	18,73	19,40	19,30	18,52
3	Acidité totale (g/l)	9,82	10,05	10,20	10,65	8,10	8,25	8,47	8,55
4	pH	2,85	2,90	2,90	2,80	2,90	2,85	2,85	2,85
5	Tanin (g/l)	0,32	0,32	0,28	0,28	0,28	0,25	0,32	0,28
6	Azote total (mg/l)	762,00	827,00	801,00	778,00	—	—	—	—
7	SO_2 total (mg/l)	81,92	88,32	85,76	83,20	201,60	256,00	243,00	254,70
8	SO_2 libre (mg/l)	36,48	39,04	37,12	40,96	89,60	121,60	112,64	124,16
9	Activité poligalacturonasique :								
	a) dans la vendange	51,00	7,40	41,40	—	62,30	0,00	37,70	—
	b) dans le moût de goutte ...	31,40	0,00	18,60	12,00	45,70	0,00	31,70	0,00
	c) dans le moût de presse ...	3,80	0,00	9,80	9,00	10,00	0,00	0,00	0,00
	d) dans le moût total	17,00	0,00	9,80	0,00	—	—	—	—

quantité du moût de goutte du cépage *Rkatzitéli* est obtenu lors de l'emploi combiné des deux préparations. La deuxième est occupée par la préparation pectolytique et la troisième, par la cellulase.

Le rendement total (moût de goutte et de presse) de même s'est manifesté comme maximal lors de l'emploi combiné, suivi par la préparation de cellulase et, en troisième rang, se situe la préparation pectolytique.

Pour le cépage *Riesling* le taux d'augmentation du rendement est bas. En ce qui concerne le moût de première goutte, le meilleur résultat est obtenu dans l'essai I — avec la préparation pectolytique, tandis que par rapport au moût de presse ce résultat est obtenu avec l'essai III, c'est-à-dire avec la combinaison des deux préparations. Du total des deux moûts, de goutte et de presse, le rendement maximal est obtenu avec l'essai III, suivi par l'essai I.

Tenant compte des résultats des deux cépages, on peut établir, que le meilleur effet résulte de l'emploi combiné des deux préparations, suivi par la préparation pectolytique et en troisième place, la préparation de cellulase. En ce qui concerne les cépages de raisin, une augmentation supérieure de moût est obtenue pour le cépage *Rkatzitéli*, ce qui peut être expliqué par la composition de la partie solide du raisin (cellulase, hémicellulase, matières pectiques, etc.) et par la spécificité du substrat des enzymes employées.

D'après les résultats obtenus, on peut admettre, pour le traitement avec les préparations mentionnées, que le raisin du cépage *Rkatzitéli* s'est avéré comme le plus convenable. Des études complémentaires sur des enzymes d'autres origines sont nécessaires pour le raisin du cépage *Riesling*.

La composition chimique du moût des deux cépages (tabl. 2) montre, que les essais sont menés avec un raisin, dont l'état de maturité est technologique (industrielle), convenable pour la production de vins de table de haute qualité. La teneur en sucre est de 19 à 20 p. 100, l'acidité totale de 8 à 10 g/l.

L'activité maximale polygalacturonasique résiduelle est marquée dans le moût de goutte de l'essai I, suivie par l'essai III. Le moût de l'essai II n'a manifesté aucune activité. Dans le moût de presse on a constaté une activité beaucoup plus faible. L'ensemble des deux moûts (moût de goutte + moût de presse) s'est classée comme moyenne.

CONCLUSION

Les résultats des essais menés nous permettent de tirer la conclusion suivante :

1° En cas d'emploi des enzymes pectolytiques et de cellulases, séparément ou conjointement, un taux maximal de moût est obtenu lors de l'emploi d'une préparation sous forme combinée. La seconde place revient à la préparation pectolytique, employée séparément et la troisième à la préparation de cellulase.

2° Des deux cépages, un meilleur résultat est obtenu avec le raisin du cépage *Rkatzitéli*, ce qui est conditionné par la qualité de la partie solide et par la spécificité du substrat de la préparation enzymatique employée.

3° L'activité polygalacturonasique résiduelle du moût est maximale dans le moût de goutte, plus basse dans le cas de combinaison des deux moûts (moût de goutte + moût de presse) et minimale dans le moût de presse.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY ON THE EFFECT OF PECTOLYTIC ENZYMATIC PREPARATIONS AND PREPARATIONS OF CELLULASE IN WINE PRODUCTION

During the 1970 campaign we studied the effect of the pectolytic enzymic preparation of *Aspergilus niger* with 2 200/PKc/g activity and the preparation of cellulase of *Trichoderma viridae* introduced independently in the combination 1 : 1.

The experiments were carried out in semi-industrial conditions in the U. E. E. 's « Vinprom » cellar at Varna.We experimented with the *Rhatziteli* and *Italian Riesling* wine-plants.

Plan of experiment :

Variant I. — Introduction of 0.05 p. 100 pectolytic preparation into grapes.
Variant II. — Introduction of 0.05 p. 100 cellulase preparation.
Variant III. — Introduction of pectolytic enzymatic preparation of cellulase.
Variant IV. — Sample with no introduction of enzymatic preparation.

We proceeded to the following operations :

Crushing of grapes with wine-press, sulphitage of *Rkatziteli* 10 g SO_2 per 100 kg, sulphitage of *Italian Tiesling* 25 g SO_2 per 100 kg.

The duration of the preparation's action was 4 hours and the temperature + 10°C.

The following conclusions were made :

1° The highest yield of must was obtained by the introduction of the two preparations in association. In second place comes the pectolytic preparation introduced separately. The preparation of cellulase remains ineffectual.

2° Pectolytic activity in the must adter treatment is greatest for Variant I. Least for Variant III. The activity of cellulase was not measured for want of a suitable method.

Pectolytic activity is higher in « drip » must than in « press » must.

Activity is greater during actual introduction of the preparation. It then decreases until alcoholic fermentation begins.

ZUSAMMENFASSUNG

BEITRAG ZUM STUDIUM DES EINFLUSSES DER PEKTOLYTISCHEN ENZYMPRÆPARATE UND DER ZELLULASEPRÄPARATE BEI DER WEINHERSTELLUNG

Im Laufe des Jahres 1970 haben wir den Einfluss einer enzymatischen, pektolytischen Preparation von *Aspergillus niger* (Aktivität 2209 PkE (g))und einer ZellulasePräparation von *Trichoderma viridae* untersucht, indem wir die Zugabe einzeln und in einer Kombination von 1 : 1 realisierten.

Dis Versuche wurden im halbindustriellen Masstab in der Kellerei « Viniprom » inVarna durchgeführt und zwar auf Rebsorten *Rkatzitéli* und *Riesling aus Italien.*

Versuchsschema :

Variante I. — Einführung, in die Reproduktion, der pektolytischen Präparation zu 0,05 p. 100.
Variante II. — Einführung der Zellulasepräparation zu 0,05 p. 100.
Variante III. — Einführung der pektolytischen Zellulasepräparation.
Variante IV. — Probe ohne Einführung enzymatischer Präparationen.

Wir haben die folgenden Operationen ausgeführt : Keltern der Weinlese in der Kelter, Schwefelung des *Rkatziteli* mit 10 g SO_2 100 kg, Schwefelung des *italienischen Rieslings* mit 25 g SO_2 100 kg.

Die Wirkungsdauer der Präparation betrug 4 Stunden, die Temperatur war + 10°C.

Folgende Schlüsse konnten gezogen werden :

1° Der höchste Mostertrag wurde bei Einführung der beiden Präparationen gemeisam, erhalten. An zweiter Stelle kam die pektolytische Präparation, allein eingeführt. Die Zellulase-Präparation blieb ohne Wirkung.

2° Die pektolytische Aktivität im Most ist am höchsten mit der Variante I, weniger aktiv mit der Variante III. Die Zellulase-Aktivität wurde nicht gemessen, mangels einer geeigneten Methode. Die pektolytische Aktivität ist besser in dem Vorlaufmost als in dem Pressmost.

Die Aktivität ist grösser im Augenblick der Zugabe der Präparation. Anschliessend lässt sie nach bis zum Einsetzen der alkoholischen Gärung.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Verhovtzeva M. I., 1965. *Microbiolgie*, **3**, 430.

(2) Kalachnikov E. Y., Lifchitz D. B., Michailovskaya B. Tz, 1967. *Unifizirovanje metodov opredelenja aktivnosti fermentnih preparatov proizvodstvenogo naznatchenja* Kiev.

(3) Nelson N. J., 1944. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375.

(4) Rodjonova N. A., Tiunova N. A., Feniksova R. V., Timohin N. M., Finkelnstein M. Z., Martinovitch L. I., 1966. *Prikl. biochim. i microbiol.*, **2**, 197.

(5) Somogyi M. S., 1945. *J. Biol. Chem.*, **161**, 89.

(6) Halliwel G., 1957. *J. Chem. Microbiol.*, **17**, 153.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 597-605.

SUBSTITUTION OF PROTEASES IN THE ENZYMIC RIPENING OF HERRING

A. RUITER

Institute for Fishery Products TNO, Ijmuiden, The Netherlands

SUMMARY

The Dutch maatjes-cured herring is a more or less fermented fishery product made from herring in the feeding stage of its annual cycle. The ripening, resulting in a particular taste and a soft consistency, is mainly due to a partial breakdown of the muscle proteins.

In herring, caught while the fish was in another stage of the cycle, or in some herring from fishing areas other than the North Sea, ripening does not occur, or only to a much lesser extent, depending on the proteolytic activity of the appendices pyloricae.

It is shown that it is possible to use these herring as well if protease preparations are added to the fish. The herring were examined organoleptically, whereas the brines were examined by chemical analysis and by gel filtration over Sephadex G-10 as well. The results of analysis showed that, as compared with « naturally »-ripened herring, the amount of larger protein fragments in the brine of enzyme-treated herring was somewhat greater, whereas these brines were poorer in small fragments. This was confirmed by gel filtration.

The methods of analysis were found to be useful in setting up a suitable concentration of enzyme preparation for the artificial ripening of herring.

INTRODUCTION

Salting of herring has been practised for ages by the Dutch fishermen. It was found already in the Middle Ages that « gibbing » of the herring to be salted greatly improved the keeping qualities. « Gibbing » means removal of the gills and part of the intestines ; thus, some of the most perishable fish organs are removed, from the blood streaming out and the salt added a brine is formed immediately, and the fish flesh is easily penetrated by this brine owing to the cavity now existing in the fish body.

Of course the aim of this method of fish curing was merely to improve the keeping quality. Through the ages, however, the specific organoleptic properties of the

product were appreciated by many people and the gibbed Dutch herring gained its reputation as a delicacy.

It is known that not all herring can be converted to a well-cured fish product with the desired taste, flavour and consistency. Spawning or spent herring is unsuitable because of a bad appearance and lack of flavour and taste in the salted product. The most satisfactory product is obtained from North Sea herring in the feeding stage which contains a considerable amount of oil or fat (up to 25 p. 100). In this stage the gonads have not yet developed. From the so-called « full herring » in which the gonads are matured, which is not in the stage of extensive feeding but which still has a high fat content, an acceptable product can be manufactured but with less taste and flavour than the feeding or « maatjes » herring.

The organoleptic properties of salt-cured maatjes herring are difficult to describe. In an advanced stage of ripening, taste and flavour resemble anchovy and, to a certain extent, old cheese. The herring flesh gradually turns softer and darker and the surface gets a glossy appearance. The cured fish is considered to be unfit for consumption when sweetish or bitter tastes are formed. These changes are dependent from the salt content of the herring and of course from the keeping temperature.

From as early as 1901 attempts were made to elucidate the (bio)chemical changes associated with the ripening of salt-cured maatjes herring. In that year, SCHMIDT-NIELSEN (7) stated that the ripening process is to be considered as an autolysis of the muscular tissue proteins caused by enzymes from the muscle itself.

Twelve years later, LIEBERT (2) combated the view that the enzymes from the muscle cells were responsible for the changes observed. He demonstrated the absence of the characteristic organoleptic properties in cured fish from which the intestines were *completely* removed before curing ; therefore he concluded that the enzymes did not have their origin in the muscle but in the intestines. He further demonstrated that it were especially the enzymes from the appendices pyloricae that promoted breakdown of the herring proteins.

Both SCHMIDT-NIELSEN and LIEBERT were of the opinion that, if any part of this ripening process is played by bacteria, their role is at any case of minor importance.

From 1953 to 1959, LUIJPEN (3) made a large number of observations and performed many analyses on salt-cured maatjes herring, from which he concluded that the appendices pyloricae indeed were responsible for the sensoric properties of the ripened product. He measured the proteolytic activity in both the muscles and various parts of the intestinal tract of herring in different stages of its annual cycle and found that, at a pH of 6.5 which is the mean pH value during the ripening process, the *endo*-peptidase activity was originated mainly from the appendices pyloricae. The same was true for the carboxypeptidases ; the aminopeptidases and dipeptidases, however, originated mainly from the muscle cells.

In gibbing practice not always the same parts of the intestines are removed ; LUIJPEN found that in those cases where the appendices pyloricae were removed, together with the stomach, ripening was greatly retarded or did not occur at all.

It is easily understandable now that, from herring in another than the feeding stage, no well-ripened product can be manufactured, as in those cases the intestinal tract is not active and the amount of proteolytic enzymes correspondingly small.

CONTROL OF THE RIPENING PROCESS

From LUIJPEN's work the question arose how far it would be possible to control the ripening process, e.g., by the aid of enzyme preparations. In that case the ripened herring could be manufactured from herring in another than the feeding stage. The question gained actuality as, in the sixties, the North Sea became overfished with respect to herring, and the Dutch fishermen were forced to look after other fishing grounds (e.g., the Irish Sea), and catch their herring there. This herring is slightly different from the North Sea herring and, in some cases, less suitable for the manufacture of ripened herring due to shortage of the enzymes required.

Early experiments in our Institute showed that maatjes herring from which the intestines had been completely removed (« gutted » herring) gave rise to a well-ripened product after the addition of a homogenate of appendices pyloricae ; the same was true for herring in other stages of its annual cycle. Even from spent herring an acceptable product could be made but, owing to the low fat content, it was somewhat inferior to the maatjes herring. (The greater palatability of fat herring, as compared to spent herring, is an important factor in the organoleptic judgment).

Similar effects were found when gutted herring were treated with a homogenate from intestines of mackerel in the feeding stage.

In the next stage of the project the effect of protease preparations made from organs of slaughter cattle was studied. These preparations were supplied by Organon N. V., Oss, The Netherlands, a large biochemical industry which now is part of the Akzo concern. Since these preparations were available in greater amounts and suitable for direct use in practice, they were considered to be of particular interest.

It was found that these preparations indeed were able to cause the desired ripening effects. The ripened herring, however, had a slight fatty acid off-taste. In later experiments this problem could be overcome by applying protease preparations low in lipase activity.

PROPERTIES AND ACTION OF THE ENZYME PREPARATION

To give an idea of the properties and action of such an enzyme preparation, the results obtained with one of the protease preparations are pointed out here. This preparation possesses a protease activity of 2.3 NF XII units and less than 0.1 lipase units per mg and leads to well-ripened products when applied to gutted herring in amounts of 1 to 2 g per kg of herring (1).

The experiment was set up as follows : A lot of spent gutted herring caught in

(1) The NF XII unit is defined as that amount of enzyme which, at 35° and pH = 7.5, in one minute produces peptides from casein having an optical density equivalent to one μmol of tyrosine at 280 nm (1). The lipase unit is that amount of enzyme which, from a standardized olive oil emulsion at 37° and at pH = 8.0, produces 1 μeq of fatty acid per minute (4).

october in the North Sea was divided into three parts and each part salted in the ratio 1 salt : 10 herring. To one of the parts a homogenate of appendices pyloricae from herring in the feeding stage, which were kept for 4 months at — 20°, was added in such an amount that the weight was equivalent to the number of appendices corresponding to the herring present. To the second part 0.2 p. 100 of the protease preparation was added. The third part served as a blank.

The herring were kept in 50 kg barrels for one week at 0°. After that period they were repacked in 6 l buckets and kept again at 0°, one bucket being used for each observation (2, 4, and 6 weeks after starting the experiment).

Observations were not restricted to organoleptic judgments but some chemical analyses were performed as well. Of course the main attention was drawn to the products of protein hydrolysis, e.g., the soluble nitrogen compounds.

It was established that, within a few days, there exists a partition equilibrium of water-soluble substances between the aqueous phase of the herring and the surrounding brine, so all analyses were made in that brine. In order to obtain reproducible results, large protein fragments were coagulated by heating the brine for 15 mn at 80°, and filtrered off subsequently.

Since a determination of only soluble nitrogen does not give information about the amount of small-size fragments like amino acids which are the result of *exo*-peptidase activity, additional analyses were found to be necessary. Thus, determinations of amino nitrogen were carried out as well. Two methods were found to be suitable : the classical procedure developed by Willstätter and Waldschmidt-Leitz (9) in which, from the slightly acidified solution, two aliquots are pipetted and titrated with NaOH to different end points, the difference being a measure for the amount of NH_2 groups ; and a more recent method based upon the colour reaction with 2, 4, 6-trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS) and developed by Okuyama and Satake (5), in which trinitrophenyl derivatives are formed and subsequently measured at 340 nm. The sensitivity of this method is about 5 times lower than that of the ninhydrin method but for this case more than sufficient and, compared to the ninhydrin method, there is less risk of contamination or other disturbances. Moreover, the determination is not sensitive to ammonium ions ; thus, a correction for ammonia is not necessary.

Ammonia was determined by titration of a steam destillate from an aliquot of the brine which was made slightly alkaline. Apart from correcting the NH_2 value found by the titration method, it may give information about possible deamination reactions.

Finally the biuret value according to Strickland (8) was estimated in order to obtain some information on the amount of greater fragments among the protein breakdown products. The values given are absorbance values, measured in the alkaline copper/peptide solutions at 570 nm and multiplied by the dilution factor and by 10^3.

The results of both organoleptic assessments and chemical analyses are given in table 1.

The results show that there are great differences between treated and untreated herring.

As to both treated herring, there is some earlier ripening in the case of herring provided with the natural enzymes, but in both cases an acceptable product could

TABLE I

Results of organoleptic evaluations and chemical analyses from experiment with ripening of spent herring

Keeping time at 0°C, in weeks	Herring + intestine homogenate			Herring + protease preparation			Herring without addition		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
Organoleptic assessment of the herring (1) :									
Flavour and taste	well-ripened	ripened with slightly bitter taste	very strong ripened with some off-taste	slightly ripened taste	well-ripened	well-ripened slightly bitter	nearly absent	as 2	as 2
Texture	soft	very soft	advanced autolysis	moderately firm	soft	soft	firm	firm	still firm
Appearance	glossy	glossy	advanced autolysis	some gloss	glossy	glossy	pale no gloss	as 2)	as 2)
Analyses in the brine :									
Total N, (mg/ml)	7.68	9.58	11.96	7.30	9.02	10.50	4.38	4.92	5.66
Amino N, (mg/ml) :									
— titration method ; corr. for NH_3	2.34	3.79	4.92	1.79	2.53	3.13	0.92	1.37	1.39
— TNBS method	2.24	3.66	4.42	1.59	2.44	2.84	0.68	1.02	1.30
Ammonia-N, (mg/ml)	0.28	0.30	0.39	0.24	0.27	0.33	0.23	0.25	0.27
Biuret value.....	2 230	2 700	3 100	2 195	2 800	3 210	580	810	1 050
Salt, % w/w	11.4	11.3	12.7	12.4	12.8	11.8	13.9	12.3	12.8
P. 100 NH_2-N(TNBS) in total N	29	38	37	22	27	27	16	21	23

(1) After soaking in water for one night in order to remove most of the salt.

be obtained. It seems that the protease preparation is somewhat poorer in *exo*-peptidase activity as compared to the intestine homogenate, this assumption being based upon the lower values found for amino nitrogen in this case. Accordingly the biuret values are slightly higher.

It should be noted that the importance of the absolute values obtained is restricted mainly to this particular experiment, since different brine to herring ratios necessarily result in different concentrations of nitrogenous substances in the brine. Nevertheless, the values are useful in setting up a concentration of enzyme preparation suitable for the ripening of herring, provided that ripening of the same kind of herring with the aid of « natural » enzymes is performed as a control.

COMPOSITION OF THE BRINES

In order to obtain more detailed information about the composition of the various brines, gel filtration over Sephadex G-10 was practised. From the clarified brines 2.0 ml was eluted over a 86 cm-long G-10 column having an internal diameter of 2.5 cm, 0.01 M phosphate buffer (pH = 7.0) in 0.1 M NaCl (6) served as an eluant, the elution rate being 30.7 ml/h. The system was protected against microbial attack by the addition of 0.02 p. 100 NaN_3 to the eluant. The column was monitored by means of a Waters R 401 differential refractometer which was used at maximal attenuation of 128 X.

From each brine a chromatogram was made, four of them being shown in figure 1. The curves recorded were from the brine of untreated herring after 2 and 6 weeks, from the protease-treated herring after 6 weeks and from the intestine-treated herring after 6 weeks. Before this experiment the column was calibrated roughly with some amino acids and small peptides, average K_d values being given in table 2 (K_d = 0 means total exclusion from the gel particles ; K_d = 1 means optimal gel penetration, e.g., in the case of NaCl).

It was observed that the elution time of various components from the column was not completely reproducible and that variations up to 10 p. 100 could occur. There was a slight tendency to longer retention times during the progress of the experiments. To make an easy comparison possible the curves in figure 1. are plotted in such a way that the peaks indicated as « amino acids » are at about the same place.

The chromatograms confirm that, in the enzyme-treated cures, more of the relatively large fragments are produced, whereas in the herring provided with intestine homogenate a greater amount of small fragments is found.

Contrary to our expectation, the chromatograms did not give much more information about ripening than what already was obtained. It is shown that, compared to the natural enzymes, the enzyme preparation has an endopeptidase rather than an exopeptidase character. Possibly the peptides produced may act as precursors for taste and flavour compounds.

As, in the blank, a slight protease activity does not even lead to a beginning of ripening, the question arises again which other biochemical changes must be considered to play a role as well in the ripening of herring. It has already been found that addition of a nucleotide preparation (e.g., 5 p.p.m. of « Ribotide » Takeda) results

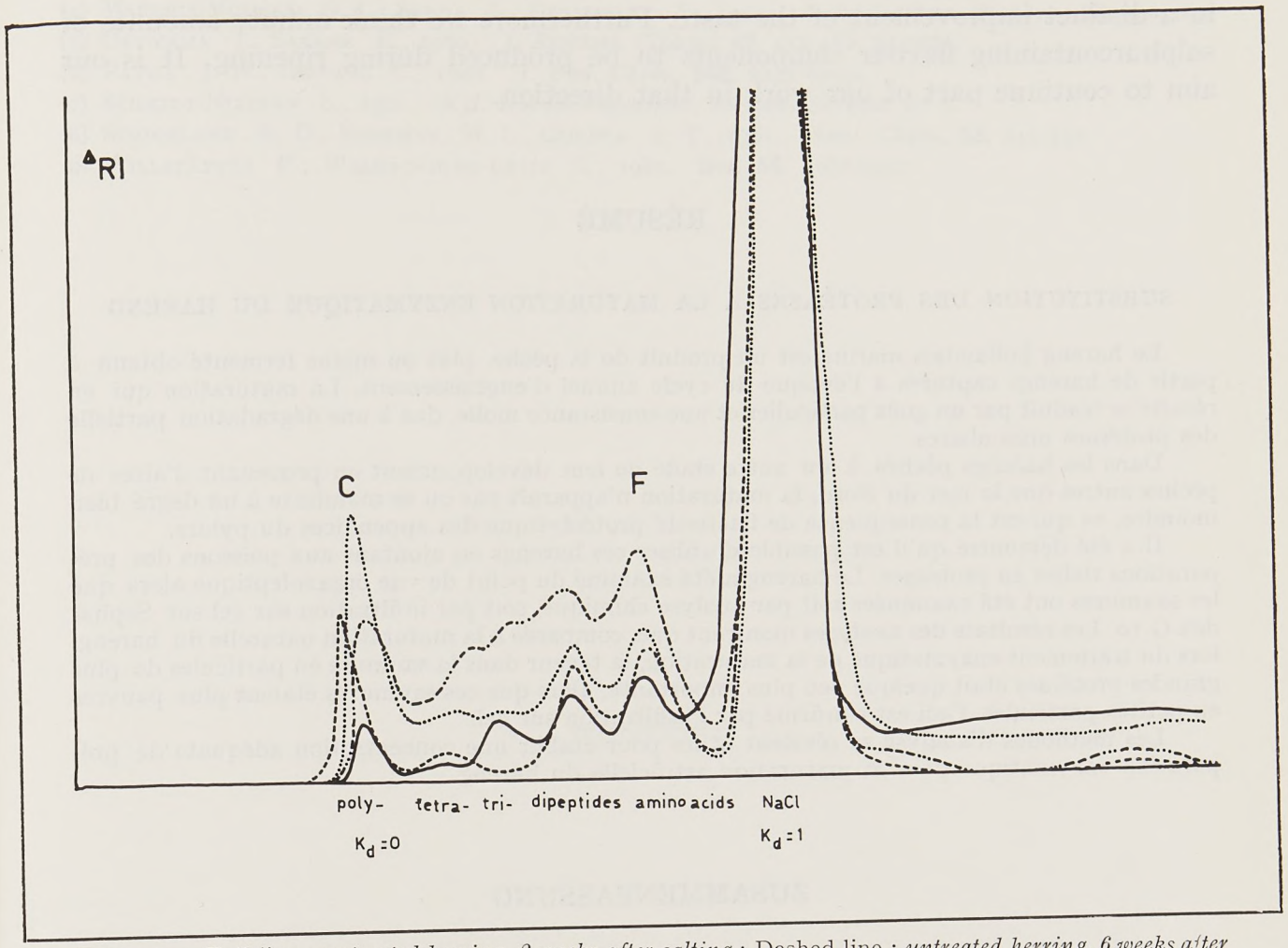


FIG. 1. — Full line : *untreated herring, 2 weeks after salting* ; Dashed line : *untreated herring, 6 weeks after salting* ; Dotted line : *enzyme-treated herring, 6 weeks after salting* ; Dashed-and-dotted line : *intestine-treated herring, 6 weeks after salting.*
Coloured compounds elute at C, flavour substances at F.

TABLE 2

K_d values for various amino acids and peptides on Sephadex G 10

All samples were eluted with 0.01 M phosphate buffer (pH = 7.0) in 0.1 M NaCl

K_d is defined as $\frac{V - V_0}{V_i - V_0}$ in which V is the elution volume for the component concerned, V_0 is the void volume, and V_i is the elution volume at optimal penetration.

Compound	K_d
Glycine	0.67
α-Alanine	0.64
Leucine	0.75
Lysine	0.58
Glycylglycine	0.53
Leucylglycine	0.56
Leucylglycylglycine	0.44
Tetra-alanine	0.29

in a distinct improvement of the taste. Furthermore we think minute amounts of sulphurcontaining flavour components to be produced during ripening. It is our aim to continue part of our work in that direction.

RÉSUMÉ

SUBSTITUTION DES PROTÉASES A LA MATURATION ENZYMATIQUE DU HARENG

Le hareng hollandais mariné est un produit de la pêche, plus ou moins fermenté obtenu à partir de harengs capturés à l'époque du cycle annuel d'engraissement. La maturation qui en résulte se traduit par un goût particulier et une consistance molle, due à une dégradation partielle des protéines musculaires.

Dans les harengs pêchés à un autre stade de leur développement ou provenant d'aires de pêches autres que la mer du Nord, la maturation n'apparaît pas ou se manifeste à un degré bien moindre, ce qui est la conséquence de l'activité protéolytique des appendices du pylore.

Il a été démontré qu'il est possible d'utiliser ces harengs en ajoutant aux poissons des préparations riches en protéases. Le hareng a été examiné du point de vue organoleptique alors que les saumures ont été examinées soit par analyse chimique, soit par infiltration sur gel sur Sephadex G 10. Les résultats des analyses montrent que, comparée à la maturation naturelle du hareng, lors du traitement enzymatique de la maturation, la teneur dans la saumure en particules de plus grandes protéines était quelque peu plus importante, alors que ces saumures étaient plus pauvres en petites particules. Ceci est confirmé par l'infiltration sur gel.

Les méthodes d'analyse se révèlent utiles pour établir une concentration adéquate de préparation enzymatique pour la maturation artificielle du hareng.

ZUSAMMENFASSUNG

SUBSTITUTION DER PROTEASE WÄHREND DES ENZYMATISSCHEN REIFENS DES HERING

Der holländische eingelegte Maatjes-Hering ist ein mehr oder weniger fermentiertes Fischereiprodukt von Heringen, die sich in der Fettansatzphase des jährlichen Zyklus befinden. Des Reifeprozess ergibt einen besonderen Geschmack und eine weiche Beschaffenheit, die auf einen teilweisen Abbau des Muskelproteins. zurückzuführen ist.

Die Reifung erfolgt nicht oder nur in geringerem Masse bei Heringen, welche in einer andren Phase des Zyklus sich befinden oder aus anderen Gewässern als der Nordsee stammen. Sie hängt von der proteolytischen Aktivität der Fortsätze des Magenpförtners ab.

Es ist nachgewiesen, dass es möglich ist, diese Heringe ebenso gut zu verarbeiten, wenn man den Fischen Protease-Präparationen beigibt. Die Heringe wurden geschmacklich untersucht, während der Pökel mittels chemischer Analyse und Gel-Filtrierung über Sephadex G 10 geprüft wird. Die Analysenergebnisse zeigten, dass, im Vergleich mit « natürlich » gereiften Heringen, der Gehalt des Pökel an grösseren Proteinteilchen bei den mit Enzymen behandelten Heringen etwas höher liegt, während diese Pökel ärmer an kleinen Teilchen sind. Dieses ist durch Gel-Filtrierung bestätigt worden.

Diese Analysenmethoden stellten sich als nützlich heraus, um eine geeignete Konzentrierung der Enzympräparation zur künstlichen Reifung des Herings zu bestimmen.

REFERENCES

(1) Int. Comm. for the Standardization of Pharmaceutical Enzymes. 4th report (concept may 1968) : *The assay of pancreatin.*

(2) Liebert F., 1913. *Rapp. verhand. Rijksinst. Visserijonderz.*, **1** (1), 124-132.

(3) Luijpen A. F. M. G., 1959. *De invloed van het kaken op de rijping van gezouten maatjesharing.* Thesis. Utrecht.

(4) Marchis-Mouren G. L., Sarda L., Desnuelle P., 1959. *Arch. Biochem. Biophys.*, **83**, 309-319,
(5) Okuyama T., Satake K., 1960. *J. Biochem.* (Tokyo) **47**, 454-466, 654-660.
(6) Payne J. W., Gilvarg C., 1968. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6291-6299.
(7) Schmidt-Nielsen S., 1901. *Kgl. Norske Videnskab. Selskabs Skrifter*, n° 5.
(8) Strickland R. D., Freeman M. L., Gurnle F. T., 1961. *Anal. Chem.*, **33**, 545-552.
(9) Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E., 1921. Ber. **54**, 2988-2993.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 607-617.

TOXICOLOGIE DES ENZYMES (PURETÉ-MYCOTOXICOSES)

Professeur P.-E. FOURNIER

*Faculté de Médecine de l'Université, Paris VIIe*
Médecin des Hôpitaux de Paris
Hôpital F.-Vidal, 200, rue du Fg Saint-Denis,
75010 Paris

RÉSUMÉ

L'étude toxicologique des enzymes industrielles comprend d'abord le danger au poste de fabrication, les enzymes étant des protéines susceptibles de déclencher des réactions allergiques et, pour certaines d'entre elles, d'attaquer directement les tissus humains ; une prévention industrielle s'impose à leur sujet.

Les enzymes ainsi préparées peuvent présenter une toxicité propre, en principe faible, mais peut-être non négligeable sur l'être humain lorsque elles seront absorbées pendant longtemps.

Des contaminations par des produits toxiques peuvent être facilement éliminées en respectant simplement la législation de répression des fraudes, et en définissant des critères de pureté relative suffisants pour la protection des êtres humains. La modification des produits alimentaires par l'utilisation massive d'enzymes méritera des études nutritionnelles en raison de l'apparition de grandes quantités de métabolites dont les effets à long terme ne sont pas connus.

Enfin, certaines contaminations liées à la fois aux produits d'où l'on peut extraire les enzymes et aux produits alimentaires sur lesquels ces enzymes agiront conduisent à recommander pendant une période d'essai le contrôle des mycotoxicoses par des prélèvements suivis d'analyses systématiques.

En d'autres termes, le caractère biologique et naturel des préparations enzymatiques ne doit pas dispenser de l'application normale de la loi du 1er août 1905 sur les additifs alimentaires et doit conduire à des études systématiques de toxicologie chronique en raison même de leur faible toxicité aiguë.

GÉNÉRALITÉS

Les enzymes sont des molécules protéiniques complexes qui sous des formes et avec des actions très variées, peuvent être isolées dans toutes les cellules vivantes.

Ce sont en effet des catalyseurs de la plupart des réactions cellulaires. Elles sont habituellement hautement spécifiques d'une réaction chimique et de la cellule

où elles se trouvent, et peuvent en être extraites par des procédés chimiques sous des formes très différentes : techniques, pures, et même cristallines.

La plupart des enzymes ont été étudiées par des biochimistes et sont actuellement répertoriées au nombre de plusieurs centaines.

Elles ont trouvé leur utilisation dans de très nombreuses branches de l'activité humaine, essentiellement en médecine et pharmacie, et dans l'industrie chimique depuis quelques années. La production d'enzymes à partir de cellules d'animaux supérieurs ou de sécrétions — l'une des enzymes techniques les plus classiques est la rennine, ou présure, préparée à partir d'estomacs de veaux, utilisée depuis de très nombreuses années en zone rurale — est l'une des branches de la pharmacie moderne.

Depuis plus de dix ans sont apparues des enzymes capables d'hydrolyser ou de modifier les protéines, les glucides, les lipides sous forme de préparations industrielles utilisables comme détergents et dans l'industrie alimentaire.

La préparation des enzymes correspond habituellement au traitement de suspensions microbiennes et comprend systématiquement des procédures d'extraction, de concentration, de purification, de stabilisation, et de contrôle.

L'extraction comprend le broyage, la lyse, ou la destruction par ultrasons. La concentration est habituellement réalisée par évaporation sous vide et par solvants. Les produits concentrés, surtout lorsqu'ils sont liquides, sont stabilisés pour éviter la présence microbienne et la perte d'activité pendant le stockage.

Parmi les adjuvants habituellement ajoutés surtout pour les produits à destinée alimentaire, l'amidon, le lactose, des sels minéraux ou des milieux tampons sont les plus courants.

DANGERS DE L'INDUSTRIE DES ENZYMES

a) *L'industrie des enzymes* est susceptible de déterminer un certain nombre d'affections. Les produits sont en effet hautement réactifs, et certains peuvent attaquer des substrats existant normalement dans les tissus humains.

En outre, la structure protéinique permet la formation d'anticorps et de réactions allergiques.

Les *enzymes protéolytiques* sont les plus dangereuses pour les ouvriers et les manipulateurs car, en présence d'humidité, elles deviennent directement actives sur la peau, les muqueuses, en particulier au niveau des yeux et des voies respiratoires. La manipulation de poudre d'enzyme peut provoquer une sécheresse, puis une rougeur, une inflammation et même une irritation cutanée au niveau du bout des doigts, une irritation nasale intense avec épistaxis, une conjonctivite, une glossite, et une stomatite.

Les affections respiratoires dues aux protéines protéolytiques, particulièrement aux extraits de *Bacillus subtilis*, sont de type assez différent.

1° affection respiratoire assez banale de type irritatif, avec signes de bronchite,

2° asthme par bronchospasme avec dyspnée expiratoire, sifflements, gêne rétrosternale parfois associés à un malaise général, à des céphalées, à des douleurs gastriques, l'ensemble constituant une réaction allergique réversible, avec forte sensibilisation aux produits bactériens incriminés.

3° Un autre type de réaction correspond à une réaction retardée plusieurs heures après l'exposition, accompagnée de malaise général et de dyspnée sévère aboutissant à un syndrome clinique et radiologique analogue au « poumon du fermier », accompagné de réactions allergiques alvéolaires. L'affection est beaucoup plus prolongée que le bronchospasme et correspond à une maladie durant plusieurs semaines, avec un retour progressif à la normale ; une inquiétude importante tient au risque de voir apparaître, à la suite de manifestations pulmonaires de 3e type, une évolution fibreuse avec réduction des capacités respiratoires.

Il est bien évident que de nombreuses associations peuvent jouer dans l'apparition de ces troubles pulmonaires comme éléments aggravants, par exemple, l'utilisation de détergents très actifs à un pH éloigné de la neutralité, la consommation tabagique, l'utilisation de certains solvants, en particulier, de solvants chlorés.

On conçoit les nécessités d'une prévention scrupuleuse de ces troubles respiratoires, et la nécessité d'un contrôle régulier du taux de poussières dans l'atmosphère et aux postes de travail.

La relative fréquence des troubles respiratoires oblige d''une part à prévoir des moyens de protection pour les ouvriers exposés et l'élimination des postes de travail, à l'embauche, de sujets porteurs de manifestations allergiques cutanées ou respiratoires ou faisant partie de la catégorie dite atopique, c'est-à-dire vouée constitutionnellement aux allergies courantes.

b) L'évolution des préparations enzymatiques, leur utilisation dans des domaines industriels proches de la pharmacie mais très proches aussi de la consommation courante et quotidienne constitue un champ d'expériences particulièrement large. Il s'agit des préparations cosmétologiques et des produits de maison.

En cosmétologie, les troubles respiratoires par enzymes protéolytiques (kératinases) sont connus. L'uréase, la lipase, et depuis quelque temps des enzymes d'oxydation pour les teintures capillaires : tyrosinase, polyphénolase, catécolase, laccase, etc. doivent être surveillées comme de véritables exemples de toxicologie humaine exprimentale à seule fin de définir les risques encourus et leur fréquence dans une population définie.

Les produits de maison.

Mais, en cinquante ans, depuis la tentative de vente d'une enzyme de nettoyage en Allemagne, en 1913, jusqu'à la commercialisation en Hollande, en 1963, d'un produit assez actif, stable à la chaleur et à une certaine alcalinisation, très peu d'études humaines ont présenté une réelle étude toxicologique du type de celle publiée par Griffith en 1969.

C'est malheureusement une anomalie constante que nous observons dans notre système européen que de voir commercialiser des produits avec un minimum d'études toxicologiques connues ou publiées utilisables, soit en faveur des manipulateurs, soit en faveur des consommateurs.

Il faut reconnaître, à l'éloge des firmes américaines et de l'organisation de la Food and Drug Administration, que la plupart des produits vendus aux U. S. A. ont fait l'objet d'études poussées permettant des discussions et des recommandations raisonnables.

Au cours de l'expérimentation citée plus haut portant deux types de protéases alcalines de *Bacillus subtilis* ou « subtilisine » additionnée à des détergents avec des

adjuvants et des formules de pré-lavage, il a été possible de définir quelques caractéristiques expérimentales comprenant : *une dose létale 50* sur le Rat et le Chien, des études de *toxicité subaiguë* de 4 semaines comprenant des examens biologiques, hématologiques, et anatomopathologiques complets, des essais de *toxicité cutanée* par application quotidienne chez le Lapin, un essai d'*irritation oculaire* chez le Lapin et même des tests humains sur volontaires d'une part, ainsi que sur de très grands groupes de ménagères bénévoles. Les tests étaient surveillés en « double aveugle » par des dermatologistes selon une formule de contrôle uniforme. Des *tests de sensibilisation* cutanée ont même été réalisés sur des groupes de 16 à 133 êtres humains volontaires.

Les résultats sont les suivants : Toxicité : DL_{50} de l'ordre de 3 grammes chez le Rat, impossible chez le Chien en raison de vomissements immédiats interdisant l'intoxication aiguë ; pas de différence d'effet avec l'adjonction au régime de 1 p. 100 de détergents contenant 0,15 à 0,25 p. 100 d'enzymes ; pas de différence de toxicité cutanée entre la préparation sans enzymes ou avec de faibles doses d'enzymes (inférieures à 5 p. 100 d'une solution à parties égales de détergent et d'enzymes) ; irritation intense, conjonctivale et cornéenne par instillation de 3 mg d'enzymes sous forme de poudre ou de solution, mais sans différence nette entre l'irritation conjontivale et cornéenne provoquée par le détergent seul et par le détergent additionné d'enzyme ; effet d'irritation cutanée notable sur le Lapin d'une solution aqueuse à 1 p. 100.

Pas de différence d'irritation cutanée chez les sujets testés par lavage de mains avec détergent contenant ou non de l'enzyme ; pas de différence de résultats pour un test portant sur 5 943 [1] ménagères avec cependant dans tous les cas de légères manifestations cutanées ; légère exagération de la sensibilition cutanée chez l'Homme par application de tests occlusifs c'est-à-dire dans des conditions d'exposition sévères.

De ce travail, il est possible de conclure qu'un contact prolongé à de fortes concentrations d'enzymes protéolytiques provoque une nette augmentation de l'irritation primaire par rapport au contrôle.

Dans des conditions d'exposition brève, — quelques minutes — et peu répétées, il n'y a pas de différence appréciable entre les produits détergents classiques et les produits auxquels on a ajouté des enzymes protéolytiques. La durée de l'exposition, la concentration des produits jouent donc un rôle essentiel dans l'apparition des troubles.

ENZYMES ET ALIMENTATION

A. — *Enzymes*

L'utilisation des enzymes dans l'alimentation, en particulier en brasserie ou dans le but d'obtenir une protéolyse de viande ou de chair de poisson n'est que le début d'une industrie très importante qui aboutira vraisemblablement à des modifications technologiques radicales.

[1] Un chiffre aussi important est nécessaire au lancement d'un produit destiné à plusieurs millions de consommateurs, pour réduire le risque d'accidents probables à moins de 200 par million.

Le propre des enzymes industrielles est leur relative pureté puisque depuis bien longtemps l'industrie des boissons fermentées, de certaines préparations végétales, et des fromages, suppose empiriquement connue l'activité enzymatique des cellules bactériennes ou des champignons.

La nouveauté consiste surtout en une action intense limitée exclusivement par des caractéristiques physico-chimiques de milieu et aboutissant à la formation de métabolites différents de ceux que réalise une culture de cellules vivantes constituant une chaîne de dégradations enzymatiques plus complète. L'apparition de métabolites « incomplets » ou « anormaux qualitativement ou quantitativement » peut être prévue.

Pour le moment, rien ne permet de proclamer que les enzymes ainsi utilisées présentent un danger certain pour le consommateur, et nous devons nous en tenir à des hypothèses, c'est-à-dire à l'énumération des risques toxiques potentiels en répétant que pour le moment, aucune publication ne permet de dire que telle enzyme industrielle s'est avérée toxique.

Il y a lieu d'envisager d'abord avec soin la *toxicologie expérimentale* chronique de tels produits en raison de leur effet certain sur les produits alimentaires et sur leur métabolisme dans le tractus digestif humain. Une consommation massive d'enzymes pourrait aboutir à un déséquilibre alimentaire sérieux. Là encore, les observations manquent, sauf pour de rares enzymes ou anti-enzymes utilisées en pathologie humaine. Les taux maxima absorbables devraient être définis à la suite d'une étude expérimentale systématique.

La *toxicité potentielle des enzymes* industrielles tiendra en outre aux *impuretés* qui pourront être liées aux procédures d'extraction, soit par contamination minérale ou organique — ce sera la plus facile à dépister —, soit par mélange à l'enzyme proprement dite d'autres substances naturelles aux effets toxiques potentiels. Aucune procédure d'extraction simple et aboutissant à un produit de faible prix ne peut en effet éliminer systématiquement tout ce qui n'est pas l'enzyme pure, et les procédés biochimiques actuellement publiés montrent que l'obtention d'enzymes purissimes ou cristallisées est extrêmement laborieuse lorsqu'elle n'aboutit pas à une impasse.

On ne peut manquer d'éprouver certaines inquiétudes en notant la liste des toxines issues des microbes ou des champignons.

L'élément le plus favorable, par contre, est l'activité extrême des produits enzymatiques qui conduit à n'utiliser qu'un pourcentage très faible de catalyseurs protéiques pour modifier le produit alimentaire. La dilution ainsi réalisée réduira d'autant le risque d'adjonctions dangereuses.

B. — *Modification de la substance alimentaire*

Le deuxième aspect toxicologique tient avant tout à la modification de la substance alimentaire par formation de dérivés en abondance plus ou moins grande, qui peuvent devenir gênants ou même dangereux lorsque d'autres procédés s'adjoindront à la préparation initiale. Par exemple, une autolyse aboutissant à la formation d'importantes quantités d'acide glutamique, devrait faire au moins réfléchir au risque des inconvénients connus après absorption de quelques grammes de glutamate de sodium : céphalées, paresthésies de la face, gêne thoracique.

Il conviendrait aussi d'être prudent si de l'histidine était formée, qui, par décarboxylation, pourrait former de l'histamine.

La lyse des chairs de poisson pourrait ainsi conduire à des accidents de type histaminique, mais répétons encore une fois qu'il ne s'agit que d'hypothèses, et que pour le moment, les grandes épidémies alimentaires observées par exemple dans l'industrie de la brasserie, des vins et des huiles sont toutes dues à des falsifications ou des fraudes introduisant dans la préparation des toxiques parfaitement connus et non hypothétiques (arsenic, plomb, phosphate de *tri- ortho-* crésyl).

Nous développerons seulement, en raison de l'inquiétude actuelle, la discussion sur le danger des mycotoxines, substances formées par certaines moisissures sur des substrats très divers et qui sont suceptibles d'apparaître lorsque les conditions de culture seront favorables.

C. — *Mycotoxicoses*

L'importance des mycotoxicoses a été soulignée depuis quelques années à la suite des grandes épidémies survenues sur des élevages de dindons et de canetons en 1960, épidémies dues à la présence dans des produits alimentaires de tourteaux d'arachides toxiques et qui ont été le point de départ d'études considérables.

Les mycotoxicoses ainsi démontrées constituent l'un des aspects les plus évidents et les plus inquiétants du risque toxicologique par contamination de produits biologiques destinés à l'alimentation.

Dépistage.

Deux méthodes de dépistage peuvent être proposées : la *recherche directe d'*Aspergillus flavus fréquemment retrouvés sur les différentes céréales ainsi que sur leurs dérivés, et qui deviennent dangereux si la pullulation est rendue possible par un degré d'humidité compatible avec le développement rapide du champignon, et l'*identification des toxines*, du groupe des aflatoxines.

a) *Recherche directe d'*Aspergillus *flavus*.

Malgré son intérêt évident, rappelons seulement que le pouvoir toxique d'un produit n'est pas obligatoirement lié à l'importance de l'infection par *Aspergillus flavus* et que des arachides très infectées n'étaient parfois que peu toxiques probablement en raison d'une destruction des aflatoxines en présence de bactéries ou de champignons actifs sur ces produits naturels.

De même, si la production d'aflatoxines est proportionnelle au poids du mycélium cultivé, c'est surtout pendant la période de croissance que la production est maximale.

Des études sur le rôle des substances facilitant ou inhibant la synthèse d'aflatoxines par *Aspergillus flavus*, montre que des milieux à azote nitrique sont défavorables à la production contrairement des milieux à azote amoniacal. Expérimentalement, Guilbot et Jemmali rappellent : « L'addition à un milieu Czapeck, de certains métaux, tels que le fer, le zinc, le magnésium, de divers nutriments carbonés — saccharose, fructose, glucose, galactose — de certains acides aminés tels que la méthionine et la glutamine, ou d'acides organiques tels que l'acide malique a eu un effet favorable sur cette production.» En 1967, Boutibonnes et Jacquet ont

souligné l'efficacité de l'amidon, du cellobiose, du tréhalose, du glycérol, et de l'esculoside ainsi que de la proline, de la phénylalanine, de l'acide glutamique, du tryptophane, de la valine, et de l'histidine. Ils ne trouvent, par contre, aucune toxinogénèse avec différentes huiles (arachide, ricin, olive, lin), et avec des acides gras saturés, ce qui conduit à rendre suspects, sans les incriminer pour autant, les procédés aboutissant à la formation de glucides ou d'acides aminés favorables à la croissance des moisissures.

b) *Détection des aflatoxines.*

Elle s'observe après extraction, le plus souvent extraction par un solvant fortement polaire comme le méthanol en sachant que l'eau en présence de bicarbonate de sodium à 1 p. 100 extrait aussi facilement l'aflatoxine.

La méthode peut être perfectionnée en concentrant la toxine par chromatographie rapide sur couche d'aluminium neutre, en l'éluant par le chloroforme puis en cristallisant dans le méthanol.

La détection biochimique se fera surtout par chromatographie sur papier et fluorescence dans l'ultraviolet. Elle risque d'aboutir à des erreurs en trop, des substances fluorescentes pouvant être notées avec un spot situé très près de la zone des aflatoxines.

Une détection spectrophotométrique a été proposée.

La plupart des méthodes s'efforcent de séparer les aflatoxines B_1, B_2, G_1, G_2, M_1 et leurs métabolites.

En toxicologie humaine, nous retiendrons la possibilité d'extraction des aflatoxines par l'eau peu alcaline, par les solvants polaires évidemment utilisés très employés pour la purification des enzymes. Les aflatoxines pourraient être aussi concentrées dans une préparation enzymatique brute.

c) *Intoxications humaines.*

1. *Faits cliniques.*

Shauk et Bourgeois ont étudié 139 cas de maladies aiguës survenant sous une forme épidémique sur des enfants du nord de la Thaïlande et comportant des signes d'encéphalopathie et de stéatose viscérale.

La maladie se manifestait par une progression rapide de troubles digestifs (vomissements), de signes nerveux : convulsions, coma et mort dans 80 p. 100 des cas hospitalisés.

A l'autopsie, on trouvait une dégénérescence graisseuse des hépatocytes, de l'épithélium tubulaire rénal et du myocarde ; le cerveau était très œdémateux.

Par d'excellentes études épidémiologiques, les auteurs démontrèrent la régularité de ces accidents, leur apparition sensiblement parallèle à l'absorption d'aflatoxines alimentaires, liée à des conditions géographiques et saisonnières : région nord, région est, plaines centrales, à la fin de la saison des pluies.

2. *Expérimentalement,* le singe souffre d'anomalies très proches lors d'intoxications par l'aflatoxine et la toxine peut être retrouvée dans le cerveau, la bile, le foie, les reins des animaux, mais de façon inconstante, même si la mort survient rapidement de 67 à 148 heures après l'intoxication.

3. *Dosages.*

Les résultats des dosages semi-quantitatifs sur l'être humain sont intéressants :

Des traces (1 à 4 μg/kg) sont retrouvées dans le cerveau, le foie, le rein de 22 enfants morts sur un groupe de 23 atteints d'encéphalopathie avec dégénérescence viscérale graisseuse.

Dans ce groupe, des taux très élevés (de l'ordre de 13 à 123 μg/kg) ont été trouvés dans le foie, les selles, ou l'estomac et de 8 mg/ml dans la bile pour l'aflatoxine B_1, des taux de 4 à 19 μg/kg dans les mêmes échantillons pour l'aflatoxine B_2 chez sept enfants.

Dans les cas où les taux sont très élevés, l'intoxication a été formellement identifiée par la méthode d'Andrellas et Reid. Les auteurs signalent que l'excrétion de l'aflatoxine par l'Enfant doit être plus lente que chez le Rat où la toxine marquée au ^{14}C est rapidement excrétée par la bile et les fèces.

Mais, dans un certain nombre de prélèvements, il n'a pas été possible de retrouver l'aflatoxine B_1.

Les auteurs signalent aussi la possibilité d'une détection chromatographique d'aflatoxine M_1 et notent la présence de traces d'aflatoxine au moins dans l'un des organes chez 10 enfants décédés appartenant à un groupe de 15 dont la mort n'était sûrement pas due à une mycotoxicose.

Cette « épidémie » est le seul ensemble clinique humain très convaincant faisant suite au cas unique de Serck-Hanssen (1970) observé en Ouganda.

Pour le moment l'intoxication par produits fabriqués contaminés n'a été démontrée que pour certains fromages (excluant le camembert et le roquefort qui inhibent la croissance d'*Aspergillus*), du pain moisi, des viandes assez desséchées et moisies, des poissons congelés. La contamination par des spores paraît fréquente sur de nombreuses graines (arachides, maïs, café non torréfié). Le lait de vache est une voie d'élimination des aflatoxines absorbées.

Barnes (1970) insiste sur la difficulté d'appréciation de l'aflatoxine sur des produits consommés après conservation, en raison de la variabilité des récoltes et des lots.

Il conseille de chercher l'information lors de la récolte et de la mise en stocks.

L'interprétation des mycotoxicoses humaines sera toujours délicate.

Expérimentalement, les différences de sensibilité selon l'espèce sont considérables : les animaux les plus sensibles étant les jeunes canards et dindons. Les cobayes, les vaches et les porcs sont moins sensibles et ne forment pas de cancers. Les rats sont extrêmement sensibles à l'effet cancérogène des faibles doses. Les primates sont sensibles aux effets subaigus et chroniques, l'effet cancérogène étant discuté. Les moutons résistent assez bien, ainsi que les souris.

Mais les études biologiques semblent montrer que les différences d'espèce tiennent surtout à des processus de dégradation différents.

Il convient pour l'Homme, de retenir la réalité de l'intoxication subaiguë observée surtout chez l'enfant, à l'occasion de périodes de disette et de régime pauvre en protéines.

La destruction assez rapide de l'aflatoxine expliquerait la difficulté de démontrer un effet cancérogène sur l'Homme, mais il serait déraisonnable de négliger un cancérogène aussi puissant que cette toxine, dont le danger est évalué à 5 000 fois celui

du jaune de beurre. Le taux de 0,03 mg/kg accepté à titre provisoire comme maximum acceptable par le groupe consultatif des protéines a paru trop élevé au professeur TRUHAUT.

La publication qui vient d'être mentionnée constitue certainement la plus indiscutable démonstration du danger des aflatoxines chez l'Homme, et la fréquence inquiétante du cancer du foie dans certaines régions du globe mérite que l'on définisse ses causes même s'il est impossible de les réduire à un seul facteur.

Enfin, il ne s'agit pas du seul groupe chimique des mycotoxines et de nombreuses autres substances dangereuses ont été décelées.

L'une d'elle a été la cause d'une autre épidémie d'intoxications d'enfants en Ukraine et de très nombreuses observations d'élevages décimés montrent l'importance pratique de ce phénomène.

On ne peut donc que souscrire aux conclusions de BARNES en faisant en outre remarquer que le traitement enzymatique est une véritable dénaturation du produit initial qui risque de ne plus pouvoir être identifié après traitement. C'est donc sur les lots primaires reçus par les industriels, surtout lorsqu'ils sont constitués de céréales, d'oléagineux ou de leurs dérivés, qu'il convient de procéder aux analyses de contrôle si l'on veut dépister à temps, et le danger et son origine.

SUMMARY

THE PURITY OF ENZYMATIC PREPARATIONS ; MYCOTOXINS

The toxicological study of industrial enzymes comprises, firstly, the danger at the place of manufacture, enzymes being proteins which are capable of triggering off allergic reactions ; some of them directly attacking human tissues ; their industrial prevention is imperative.

Enzymes thus prepared may present a particular toxicity, as a rule weak, but perhaps not negligible in human beings when absorbed over a long period.

Contamination by toxic substances can easily be eliminated by simply respecting the legislation of fraud repression, and by defining the criteria of relative purity, adequate for the protection of human beings. The modification of foods by mass use of enzymes deserves nutritional study on account of the appearance of large quantities of metabolites, the long term effects of which are not known.

Finally, some contaminations linked both to the substances from which enzymes can be extracted and to the foods on which the enzymes will act, lead to the recommendation that, for a test period, the control of mycotoxicoses followed by systematic analyses, be performed.

In other words, the biological and natural characteristic of enzymatic preparations must not be exempt from the normal application of the law of 1st August 1905 concerning alimentary additives, and must lead to systematic studies of chronic toxicology on account of their slight acute toxicity.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE REINHEIT ENZYMATISCHER PRÄPARATIONEN, DIE MYKOTOXINE

Die toxikologische Untersuchung der industriellen Enzyme beginnt mit den Gefahren am Herstellungsplatz, da die Enzyme Eiweisstoffe sind und somit allergische Reaktionen hervorrufen können und manche unter ihnen sogar direkt die menschlichen Gewebe anzugreifen im Stande sind : industrielle Vorbeugungsmethoden sind des halb ihnen gegenüber angezeigt.

Die so hergestellten Enzyme können eine eigene, im Prinzip, schwache Toxizität aufweisen, die sich aber, über längere Zeit regelmässig zugeführt, für den menschlichen Organismus als schädlich erweisen kann.

Verunreinigungen durch toxische Produkte können leicht vermieden werden, wenn die entsprechenden gesetzlichen Vorschriften respektiert und die für den genügenden Schutz des Menschen nötigen Reinheitsgrade definiert werden. Die Veränderungen der Nahrungsmittel durch massiven Enzymzusatz verdienen ernährungswissenschaftliche Studien, durch das Auftreten grosser Mengen von Metaboliten, deren Auswirkungen, sich auf lange Zeiträume erstreckend, nicht bekannt sind.

Schliesslich führen gewisse Verunreinigungen, die einerseits mit den für die Enzym-Extraktion nötigen Rohprodukten und andererseits mit den Lebensmitteln, mit denen die zugesetzten Enzyme reagieren, in Zusammenhang zu bringen sind, zu dem Vorschlag während einer Versuchsperiode die Mykotoxikosen systematisch zu kontrollieren.

Anders gesagt, der biologische und natürliche Charakter der enzymatischen Präparationen darf nicht die normale Anwendung des Gesetzes vom 1° August 1905 über die Lebensmittelzusatzstoffe ausschliessen und muss zu systematischen Untersuchungen chronischer Vergiftungserscheinungen führen, eben darum weil sie nur eine schwach akute Toxizität aufweisen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. — *Affections professionnelles*

Enzymes in the wash-tub, 1970. Pure white toxicology. *Fd Cosmet. Toxicol.*, **8**, 4, 431-432.

Greenberg M., Milne J. F., *et al.*, 1970. Survey for workers exposed to dusts containing derivatives of *Bacillus subtilis*. *Br. Med. J.*, **2**, 629.

Wuthrich B., Ott F., 1969. Berufs Asthma durch Proteasen in der Waschmittel Industrie. n° 1961. *Schweiz. Med. Wschr.*, **99**, 1584.

Griffith J. F., Weaver J. E., Whitehouse H. S., *et al.*, 1969. Safety evaluation of enzyme detergents. Oral and cutaneous toxicity, irritancy and skin sensitization studies. *Food and Cosmetics*, **7**, 6, 581-593.

2. — *Risques alimentaires*

Chantegrelet G., 1968. Toxi-infections provoquées par les produits de charcuterie. *Ann. Hyg. de Langue française*, **4**, 1, 93-103.

Creff A.-F., Dumay M., 1968. Actualité sur les « aliments-médicaments ». *Immex*, n° 5, mai, p. 575-581.

Dehove R.-A., 1967. La législation relative aux produits alimentaires en France. *Prod. et Prob. Pharm.*, **22**, 9, 709-712.

Ferrando R., 1968. La législation des aliments des animaux domestiques. *Bull. de l'Inserm*, **23**, 2, 281-292.

Girond J., 1964. Risques de cancérisadtion dus aux agents chimiques incorporés aux aliments. *Sem. méd. profes. et médico sociale*, (*Sem. Hôp.*) n° 4, 20 février, p. 72-76.

Mocquot G., 1968. Technologie alimentaire. *Bull. de l'Inserm*, **23**, 2, 269-280.

Ruasse J.-P., Gounelle de Pontanel H., *et al.*, 1971. Les lacunes de la réglementation française concernant l'hygiène de l'alimentation. *Bull. de Acad. nat. Mèd.*, **155**, 6, 406-423.

Pattin S., Laverdant Ch., 1970. Revue des incidents et accidents consécutifs à la consommation de poisson de mer. *Ann. Hyg. L. fr. — Méd. et Nut.*, **6**, 2, 71-78.

Richir Cl., 1964. Réflexions sur l'étiologie des cancers du foie. *La revue de Médecine*, mai, p. 479-487.

Schaumburg H. H., Byck R., Gerstl R., Mashman J. H., 1969. Monosodium L-Glutamate : its Pharmacology and role in the Chinese Restaurant Syndrome. *Science*, **163**, n° 3869, p. 286-287.

Les moisissures toxiques, 1967. *La Presse Médicale*, **75**, 6, 4 février, p. 262.

3. — *Aflatoxines et mycotoxicoses*

Alpert M. E., Hutt M. S. R., Nogan G. N., *et al.*, 1971. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. *Cancer*, **28**, 1, 253-260.

Fehr P.-M., Delage J., 1970. Effet de l'aflatoxine sur les fermentations du rumen. *Cah. Nut. Diét.*, **5**, 2, p. 59-60.

Guilbot A., Jemmali M., 1970. Conditions de production de l'aflatoxine : Influence des composants du milieu de culture sur la production de la toxine. *Cah. Nut. Diét.*, **5**, 2, p. 51-52.

MORLAU Cl., 1967. *Moisissures toxiques dans l'alimentation.* Édition P. Lechevallier, Paris,

PORTMAN R. S., PLOWMAN K. M., *et al.*, 1970. On mechanism affecting species susceptibility to Aflatoxin. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **208**, 3, p. 487-495.

SHANK R. C., BOURGEOIS Ch., *et al.*, 1971. Aflatoxins in autopsy specimens from Thai children with an acute disease of unknown aetiology. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **9**, 4, p. 501-507.

SULLMAN S. F., ARMSTRONG S. J., 1970. Further studies on the toxicity of the Aflatoxins on human cell cultures. *Brit. J. Exper. Pathology*, **22**, 3, p. 314-316.

L'action cancérogène des aflatoxines est plus marquée en cas de diète protéique. N° 31, Supplément *La Semaine des Hôpitaux*, n° 47, 14 nov., 1967, p. 27.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 619-627.

BEITRAG ZUR HYGIENISCH-TOXIKOLOGISCHEN BEURTEILUNG DER ENZYMANWENDUNG

R. ENGST und H.-J. LEWERENZ

Zentralinstitut für Ernährung der Akademie der Wissenschaften der D.D.R., Potsdam-Rehbrücke D. D. R.

ZUSAMMENFASSUNG

Enzyme werden häufig aus Kulturfiltraten von Mikroorganismen gewonnen, bei denen die gleichzeitige Bildung von toxischen Stoffen (Mykotoxinen) nicht auszuschliessen ist. Es gibt Mikroorganismen, die von vornherein als brauchbare Enzymproduzenten gelten. In diesem Zusammenhang sind zu erwähnen nichtpathogene und nichttoxische Kulturen der *Aspergillus oryzae*, der *Aspergillus niger* und der *Bacillus subtilis-Gruppe*. Andere, wie die der *Aspergillus flavus-Gruppe* sind als Toxinbildner prädestiniert.

Weitere Aufmerksamkeit ist der Reinheit von Enzympräparaten zuzuwenden, die pathogene Mikrooganismen, bedenkliche oder technologisch vermeidbare Fällungs- und Klärmittelreste und andere gesundheitsschädliche Stoffe nicht enthalten dürfen. Hierzu gehören auch toxische Schwermetalle wie As, Pb, Zn und Cu, die nur unterhalb festgelegter Toleranzen vertretbar erscheinen.

Enzympräparate für die Lebensmittelherstellung sind nach Auffassung des zuständigen F. A. O./W. H. O. Commitees Zusatzstoffe. Dieser Auffassung hahen sich die meisten Länder angeschlossen. In der Deutschen Demokratischen Republik werden diese Präparate als Zusatzstoffe durch die Definitionen des § 4 des Lebensmittelgesetzes gleichzeitig zu « Fremdstoffen ». Sie unterliegen somit besonderen Zulassungsbedingungen.

Neben dem Nachweis der technologischen Nützlichkeit des Enzympräparates, die einen echten Fortschritt zugunsten der Gesamternährungssituation einschliessen muss, bedarf es einer Absicherung in lebensmittelhygienisch-toxikologischer Sicht. D. h., die gesundheitliche Unbedenklichkeit muss mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Die notwendigen Aufschlüsse werden durch Verträglichkeits- und Toxizitätsuntersuchungen erhalten, denen die grundsätzlichen Richtlinien zur toxikologischen Beurteilung von Zusatzstoffen zugrunde zu legen sind. Sie werden im Referat eingehender diskutiert. Besondere Aufmerksamkeit ist möglichen Spätschäden zuzuwenden. Untersuchungen an Menschen erscheinen nur vertretbar, wenn direkt erkennbare toxische Wirkungen ausgeschlossen wurden, Spätschäden unwahrscheinlich erscheinen und das Tierexperiment zudem den Nachweis der Verträglichkeit erbracht hat. Im Zweifelsfalle sind die unter Enzymeinsatz produzierten Lebensmittel in die toxikologischen Untersuchungen einzubeziehen. Unter der Voraussetzung, dass die diskutierten Sicherheitsmassnahmen eingehalten werden, ist die Enzymanwendung in der Lebensmittelherstellung ein echter Fortschritt.

EINLEITUNG

Das zur Zeit durchgeführte Symposium bestätigt durch seine Themenstellung und die eindrucksvollen wissenschaftlichen Beiträge, dass die Enzymanwendung zu den zukunftsträchtigen Verfahren in der Lebensmittelindustrie gehört. Es weist aber auch darauf hin, dass die Enzymanwendung nicht ohne Probleme ist und dass es grosser Anstrengungen bedarf, ihre Vorteile optimal zu nutzen, ohne dabei gleichzeitig bedenkliche Nachteile einzuhandeln.

Gemeint ist das gesundheitliche Risiko, das beim Enzymeinsatz in der Lebensmittelindustrie nicht von vornherein zu vermeiden ist. Dieses Risiko muss aber ausgeschlossen werden, wenn der unbedenkliche Einsatz von Enzympräparaten gewährleistet sein soll.

Drei wesentliche Aspekte seien erwähnt, die es notwendig machen, die Verträglichkeit von Enzympräparaten zum Schutze des Verbrauchers zu untersuchen :

1. ist auszuschliessen, dass bei der mikrobiellen Gewinnung von Enzymen Toxine entstehen ;
2. dürfen mit der Nahrung aufgenommene Enzyme den normalen Stoffwechsel des Menschen nicht beeinflussen, und
3. ist darauf zu achten, dass Verunreinigungen, die von der Enzymgewinnung her dem Präparat anhaften, entfernt oder aber auf ein verantwortbares Mass reduziert werden.

Die hieraus resultierenden Untersuchungen machen offenbar, dass die Verträglichkeitsuntersuchungen unter Berücksichtigung toxikologischer Kriterien durchzuführen sind. Es gilt also nicht nur, die verträgliche Konzentration eines Präparates zu ermitteln, sondern es sind besonders auch ausgesprochene Schadwirkungen zu erkennen und zu beschreiben.

PROBLEME DER TOXIZITÄT VON ENZYMPRÄPARATEN

Zahlreiche Mikrooganismen sind zur Bildung von Toxinen befähigt. Es ist daher naheliegend, dass die Herstellung von Enzymen aus Mikroorganismen latente Gefahren für die Gesundheit des Verbrauchers in sich bergen kann (1).

Besonders problematisch erscheint in dieser Hinsicht die Verwendung von Pilzen als Enzymproduzenten. Innerhalb von 10 Jahren wurde bei etwa 30 Pilzarten die Produktion toxischer Verbindungen, der « Mykotoxine », nachgewiesen (2). Diese Zahl ist heute bereits weit überschritten. Eine Toxinbildung ist besonders am Beispiel des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus* spektakulär geworden. Die von ihm gebildeten Aflatoxine besitzen eine starke akute Toxizität (3).

Die orale LD_{50} z. B. von Aflatoxin B_1 wird für Ratten mit 7 mg/kg Körpergewicht angegeben (4). Noch viel bedenklicher ist jedoch, dass die Aflatoxine bei chro-

nischer Einwirkung zu pathologischen, darunter auch krebsartigen Veränderungen der Leber führen.

Für die Enzymgewinnung setzt man natürlich nur Pilze ein, die als Nichttoxinbildner bestätigt worden sind. Man muss aber besondere Sorgfalt auf die Reinheit der zur Enzymgewinnung angesetzten Kulturen richten, um Fremdinfektionen und damit die Entwicklung pathogener Mikroorganismen auszuschliessen.

Enzympräparate können als unbedenklich angesehen werden, wenn « sie von nichtpathogenen, nichttoxischen Kulturen der *Aspergillus oryzae*, der *Aspergillus niger* und der *Bacillus subtilis*-Gruppe produziert werden unter der Voraussetzung, dass die Nährkulturen übliche, verkehrsfähige Lebensmittel sind » (1). Diese Feststellung darf nicht zu dem Schluss verleiten, Mikrooganismen der obengenannten Gruppen oder daraus gewonnene Enzympräparate seien einschränkungs- und bedingungslos unschädlich. Wir kennen z. B. pektolytische Präparate aus Emers- und Submerskulturen von *Aspergillus niger*, die in einigen Fällen bei den Versuchstieren zur Entstehung subkutaner Abszesse im Bereich der Milchdrüssen, zu Veränderungen der Leber und Nebennieren, zu Gewichtsverlusten und bis zu einer derartigen Verschlechterung des Allgemeinzustandes geführt haben, dass die Tiere vereinzelt zum Exitus gekommen sind (5). Offensichtlich spielt dabei auch die Zusammensetzung der Nährlösung für die Pilze eine Rolle. Die negativen Eigenschaften der erwähnten pektolytischen Präparate wurden nämlich mit dem hohen Zuckergehalt der Nährsubstrate in Verbindung gebracht.

Bis heute gibt es nur begrenzte chemische Möglichkeiten, Toxinbildungen — vor allem in akut unterschwelligen, d.h. bei einmaliger Verabreichung nicht toxisch wirksamen Konzentrationen — nachzuweisen. Das aber wäre notwendig, weil wir gerade mit diesen Fällen in der Praxis konfrontiert werden. Für die in den letzten Jahren viel beschriebenen Aflatoxine sind chemische Methoden vorhanden, die kurzfristige Aussagen über Aflatoxingehalte gestatten. Neben einfachen dünnschicht-chromatographischen, die aflatoxinvortäuschende Substanzen miterfassen und somit in der Ergebnisfindung evtl. zu pessimistisch sind, besitzen wir UV- und IR-spektrometrische Verfahren, die — speziell auf Aflatoxine bezogen — weitere langwierige toxikologische Untersuchungen überflüssig machen könnten (6). Da aber gleiche Voraussetzungen für andere Toxine fehlen, deren Natur bzw. Struktur uns teilweise noch gar nicht bekannt sind, ist die aufwendige und zeitraubende tierexperimentelle Toxikologie zur Zeit die einzig sichere Grundlage für verantwortbare Aussagen.

Ergänzend sei eine weitere Gruppe toxischer Stoffwechselprodukte genamt, die bei mikrobiellen Enzymgewinnungen ebenfalls entstehen können. Es handelt sich um ungewöhnliche Aminosäuren von häufig toxischem Charakter. Die zur Enzymbildung prädestinierte *Bacillus subtilus*-Gruppe z.B. produziert Bacitracine und Subtiline (7). Diese Substanzen sind antibiotikaähnlich und -wirksam. Als Bestandteil der cyklischen Peptidkette des Bacitracins A wurden die ungewöhnlichen Aminosäuren D-Phenylalanin und D-Ornithin isoliert. Was bei Verwendung von *Bacillus subtilis* möglich ist, kann bei anderen mikrobiellen Enzymproduzenten nicht von vornherein unmöglich sein.

Die Schlussfolgerung der bisherigen Erörterungen ist, dass man auch als harmlos geltende Mikroorganismen für die Enzymproduktion nicht verwenden kann, ohne die Verträglichkeit der Enzympräparate zu überprüfen.

Folgende Anforderungen sind in jedem Fall zu stellen (1) :

1. Enzympräparate sollten Fällungs- und Klärmittel und andere Zusatzstoffe nicht enthalten, sofern diese Mittel nicht selbst Lebensmittel darstellen oder mit allgemein zugelassenen Zusatzstoffen identisch sind.

2. Sie dürfen pathogene und toxische Mikroorganismen, nachweisbare Spuren anderer gesundheitlich bedenklicher Verunreinigungen und gesundheitlich bedenkliche Enzymkomponenten einschl. ihrer Stoffwechselprodukte nicht enthalten.

3. Sie dürfen mit höchstens 3 p.p.m. Arsen, 10 p.p.m. Blei, 25 p.p.m. Zink oder 50 p.p.m. Zink und Kupfer zusammen verunreinigt sein.

ENZYMPRÄPARATE ALS ZUSATZSTOFFE

Nach den Auffassungen des gemischten F. A. O./W. H. O. Codex-Committees für Zusatzstoffe sind Enzympräparate Lebensmittelzusätze (1). Sie sollten damit den für Zusatzstoffe empfohlenen Zulassungsanforderungen unterworfen werden : d.h., zum Schutze des Konsumenten vor gesundheitlichen Schäden sind sie insbesondere auf ihre Unbedenklichkeit zu untersuchen (8) und « nur zulässig, wenn Tierversuche auch bei langdauernder Zuführung in einer Dosierung, die erheblich über der in der Nahrung zu erwartenden Konzentration und Menge liegt, keine schädigenden Wirkungen ergeben (9) ».

In der Deutschen Demokratischen Republik findet die Enzymanwendung durch die § § 4 (1) und 6 (5) des Lebensmittelgesetzes ihre grundsätzliche Regelung (10). Gem. § 4 (1) sind « alle Stoffe Fremdstoffe im Sinne des Gesetzes, die den betreffenden Lebensmitteln nach Art und Menge und von Natur aus oder auf Grund herkömmlicher physikalischer Behandlungsverfahren nicht eigen sind und als Bestandteile der Lebensmittel mitgegessen oder mitgetrunken werden. »

Damit ist eindeutig, dass in Lebensmittel eingehende Enzymzusätze Fremdstoffe sind. Sie dürfen nach § 6 (6) des Gesetzes in Lebensmitteln nur enthalten sein, sofern sie durch den Minister für Gesundheitswesen ausdrücklich zugelassen sind.

Die Bedingungen für die Zulassung umschreibt der § 6 (5) des Gesetzes. Es heisst : « Bei Verfahren zur Gewinnung, Herstellung, Bearbeitung bzw. Verarbeitung von Lebensmitteln muss nachgewiesen sein, dass diese hygienisch und gesundheitlich unbedenklich sind. Die Anwendung dieser Verfahren ist nur zulässig mit Genehmigung des Ministeriums für Gesundheitswesen bzw. der von ihm beauftragten Organe. »

Dem Nachweis, der gefordert wird, werden im Prinzip auch in unserem Lande die Verfahren zur toxikologischen Beurteilung von Zusatzstoffen zu Grunde gelegt, wie sie in den Publikationen der gemischten W. H. O./F. A. O.-Expertenkomitees zur Anwendung empfohlen sind (11). In diesem Sinne hat die toxikologische Bewertung eines Präparates wie für jeden anderen Lebensmittelzusatz zur erfolgen. Die Anforderungen wurden für unsere Verhältnisse von uns (12) präzisiert.

Danach steht am Anfang die akute Toxizitätsuntersuchung, die nach Möglichkeit an mehreren Tierarten — in Frage kommen Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen — vorzunehmen ist, um Speziesunterschiede zu erfassen. Das Kriterium für

die akute Toxizität ist die mittlere letale Dosis (LD_{50}), die statistisch ermittelt wird. Man versteht darunter die Menge einer Substanz, bei der 50 p. 100 einer Gruppe von Tieren einer bestimmten Art getötet werden. Die Beobachtungen umfassen ausser der Mortalität Auftreten und zeitlichen Verlauf von Vergiftungserscheinungen sowie Organveränderungen der verendeten Tiere. Präparate, die in kleinen Dosierungen bereits akut toxisch wirken, kommen als Lebensmittelzusätze überhaupt nicht in Frage. Nach den von uns ausgewerteten Angaben (5, 13, 14) zeigte keines der bisher untersuchten Enzympräparate bei einmaliger Applikation in Dosierungen bis zu 5 g/kg Körpergewicht einen akuten Effekt. Mit der Untersuchung der akuten Toxizität kann aber zu Auswirkungen eines Zusatzstoffes auf die menschliche Gesundheit im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme noch keine verbindliche Aussage getroffen werden.

Viel wichtiger ist daher die Toxizität nach wiederholter oraler Applikation kleinster Dosen über einen längeren Zeitraum. Nur aufwendige subchronische und chronische Untersuchungen sowie Fortpflanzungs- und Generationsversuche können solche Aufschlüsse verschaffen.

Subchronische Versuche erstrecken sich im allgemeinen über eine Zeitspanne, die etwa 10 p. 100 der mittleren Lebensdauer der jeweiligen Versuchtierart ausmacht. Für Ratten und Mäuse sind das ungefähr 90 Tage. Chronische Toxizitätsuntersuchungen werden mit Mäusen etwa 18 Monate, mit Ratten etwa 2 Jahre durchgeführt. Langzeitversuche mit Hunden werden im allgemeinen für einen Zeitraum von 1 bis 2 Jahren festgelegt. Ziel aller Versuche ist es, die biologische Natur toxischer Effekte und eine mögliche kumulative oder summative Wirkung zu erkennen.

Die zu untersuchenden Präparate sind in abgestuften Konzentrationen zu verfüttern, um

1. die höchste Dosis, die noch keine erkennbaren Wirkungen ausübt (no-effect-level) und
2. die niedrigste Dosis, die gerade noch erkennbare Schädigungen verursacht, zu ermitteln.

Die zweckmässige Dosierung des Präparates bei chronischen Untersuchungen muss aus den Resultaten der akuten und subchronischen Versuche abgeleitet werden. Spätschäden, die im Zusammenhang mit langwährenden Nahrungsaufnahmen besonders der Beachtung bedürfen, können im allgemeinen nur durch chronische Versuche (Langzeit-Fütterungsversuche) zuverlässig erkannt werden. Besonders wichtig erscheint die Erkennung einer möglichen cancerogenen Wirksamkeit. Substanzen, die unter den Bedingungen des Tierexperiments krebserregend wirken, müssen in jedem Falle als höchstbedenklich gelten und können daher als Lebensmittelzusatzstoffe nicht in Frage kommen (9).

Zur Beurteilung der biologischen Aktivität müssen während des Versuches Untersuchungen in bestimmten Zeitabschnitten und nach Beendigung der Präparatverfütterung vorgenommen werden. Die Wirksamkeit einer Substanz kann sich sowohl in einer morphologischen Veränderung des Tieres oder seiner einzelnen Organe bzw. Organsysteme als auch in einer Veränderung der Funktion zu erkennen geben. Zur toxikologischen Bewertung sind deshalb pathologisch-morphologische und klinisch-funktionelle und biochemische Untersuchungen gleichermassen notwendig (15).

Bei diesen Untersuchungen werden daher :

Allgemeinverhalten,
Gesundheitszustand,
Gewichtsverlauf,
Futteraufnahme und -verwertung,
Lebensdauer,
Blutstatus und chemische Zusammensetzung des Blutes, Urinbestandteile,
Organfunktionen und -gewichte,

sowie die makroskopische und mikroskopische Pathologie berücksichtigt. Die Beobachtungen werden immer mehr auf die Erkennung eines möglichen Einflusses der Enzympräparate auf Enzyme von Serum und Organen ausgedehnt. Sowjetische Autoren orientieren sich bei den Toxizitätsprüfungen von Enzympräparaten auf die Enterokinase und die alkalische Phosphatase der Dünndarmschleimhaut (5, 13, 14).

Eine grosse Bedeutung kommt den Fortpflanzungs- und Generationsversuchen zu. Sie sollten auf mindestens 3 Generationen ausgedehnt werden, um eventuelle Fertilitäts- und Laktationsstörungen sowie die Erkennung teratogener und mutagener Effekte mit einiger Sicherheit zu ermöglichen.

Die in diesen Experimenten für das Versuchstier ermittelte unschädliche Tagesaufnahme der geprüften Substanz bildet die Grundlage für die Festlegung einer zumutbaren Konzentration im Lebensmittel.

Eine unmittelbare Übertragung der am Versuchstier ermittelten Ergebnisse auf den Menschen ist wegen der unterschiedlichen physiologischen Verhältnisse nicht statthaft. Auf die für den Menschen vermutlich unbedenkliche Dosis — auch acceptable daily intake genannt — kann deshalb nur unter Einführung einer Sicherheitsspanne extrapoliert werden. Nach W. H. O. -Empfehlungen sollte bei Zusatzstoffen im allgemeinen eine Sicherheitsspanne von 1 : 100 eingehalten werden ; d.h., dass man dem Verbraucher mit den Lebensmitteln höchstens 1/100 der beim Versuchstier als gerade noch unschädlich erkannten Dosis zuführen darf.

Nach den derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen geben die diskutierten Versuchsführungen und Bewertungsgrundlagen eine ausreichende Garantie für die Ermittlung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit auch eines Enzympräparates im Lebensmittel. Vorläufig besteht noch keine Aussicht, die aufwendigen tierexperimentell-toxikologischen oder Verträglichkeitsprüfungen durch spezifische chemische Untersuchungen zu ersetzen. Man muss daher einkalkulieren, dass die Absicherung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit der Enzympräparate bis auf weiteres zeitaufwendig bleibt.

Bei den Entscheidungen ist ein sinnvoller Kompromiss zwischen der Sorgfaltspflicht und den Vorteilen der Enzymanwendung für die Gesamternährungssituation zu schliessen. Ein verbleibendes Restrisiko muss von den sicheren Vorteilen um ein Vielfaches überwogen werden. Man sollte daher nicht formal den Enzymeinsatz erschweren. Er kommt u. E. — auch ohne Langzeit- und Generationsversuche — bereits bis zur endgültigen Entscheidung in Frage,

1. wenn subchronische Versuche (90-Tage-Test) keine Hinweise auf toxische Effekte ergeben,

2. wenn Anhaltspunkte für cancerogene oder sonstige Spätwirkungen innerhalb

dieser Zeit — auch aus Literaturhinweisen oder Analogieschlüssen — nicht erhalten werden können und

3. wenn feststeht, dass mehr als vernachlässigbare Spuren nicht auf Lebensmittel übergehen.

Die Ausschaltung des Restrisikos muss dann nach Anlaufen der Versuchsproduktion bis zu einer endgültigen Entscheidung noch betrieben werden, Enzymeinsatz und -produktion können in diesem Falle somit nur bedingt erfolgen.

EINWIRKUNG DES ENZYMEINSATZES AUF DIE PRODUKTEIGENSCHAFTEN

Auch für Lebensmittel, die unter Anwendung von Enzymen hergestellt oder behandelt worden sind, kommt bisweilen eine Verträglichkeitsprüfung in Frage (13). Unter der Einwirkung von Enzymen können nämlich die Eigenschaften des Produktes verändert oder in ihrer Qualität unbekannte Lebensmittel erzeugt werden. Zur Ausschaltung dieses Risikos empfiehlt sich daher im Zweifelsfall — also wenn Anhaltspunkte für fragwürdige Veränderungen vorhanden sind — auch für produzierte Lebensmittel die Durchführung von Tierversuchen. Unter ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten sollte in diesen Fällen mit der Diät ein möglichst grosser Anteil des behandelten Lebensmittels verfüttert werden.

SCHLUSSFOLGERUNG

Bei Beachtung der diskutierten hygienischen und toxikologischen Grundsätze erscheint die Enzymanwendung in der Lebensmittelindustrie ein grosser Fortschritt. Sie ist in der Lage, qualitativ bessere und mehr Lebensmittel auf ökonomische Weise zu erzeugen.

RÉSUMÉ

CONTRIBUTION A L'APPRÉCIATION DES ASPECTS HYGIÉNIQUES ET TOXICOLOGIQUES DE L'EMPLOI DES ENZYMES

On obtient souvent les enzymes à partir de filtrats de cultures de microorganismes, où la formation dans le même temps de substances toxiques (mycotoxines) n'est pas exclue. Il y a des microorganismes qui sont de prime abord des producteurs utilisables d'enzymes, comme par exemple les cultures non-pathogènes et non-toxiques de l'*Aspergillus oryzae*, d'*Aspergillus niger* et du *Bacillus subtilis*. D'autres groupes comme celui de l'*Aspergillus flavus* ont une forte tendance à former des toxines.

Une attention particulière doit être apportée au contrôle de la pureté des préparations enzymatiques, qui ne doivent pas contenir de microorganismes pathogènes, de résidus suspects résultant de l'emploi de produits de précipitation ou de clarification ou d'autres substances susceptibles d'être nuisibles à la santé. Elles doivent être exemptes de métaux lourds toxiques tels : As, Pb, Zn et Cu, qui ne peuvent être tolérés que dans les limites légalement prescrites.

Selon l'avis du Comité F. A. O./O. M. S. les préparations enzymatiques destinées à la fabrication des aliments constituent des additifs. La plupart des pays se sont déclarés d'accord avec cette conception. En République démocratique allemande, ces préparations sont déclarées comme « additifs » et en même temps comme « substances étrangères » conformément aux définitions du § 4 de la Loi sur les Aliments. Elles sont en conséquence soumises à des conditions spéciales d'admission.

En dehors de l'épreuve d'utilité technologique de la préparation enzymatique qui doit constituer un véritable progrès dans le cadre général de la nutrition, il est nécessaire d'en garantir la sécurité au point de vue de l'hygiène alimentaire et toxicologique, c'est à dire il faut apporter la preuve avec une probabilité voisine de la sécurité, de l'absence de tout danger pour la santé. Les données nécessaires résultent des examens d'acceptabilité et de toxicité basées sur les prescriptions fondamentales d'examen toxicologique des substances d'addition. Celles-ci sont discutées plus largement dans le rapport qui traite notamment de la possibilité de dommages ultérieurs. L'homme ne peut servir de test pour ces essais que si on a pu exclure les possibilités de manifestations toxiques directes et si l'apparition de dommages à long terme est invraisemblable et si l'expérimentation sur l'animal a donné des résultats positifs.

En cas de doute, les aliments fabriqués en utilisant des enzymes doivent être soumis aux examens toxicologiques. Sous la condition que l'on se conforme aux mesures de sécurité, l'emploi des enzymes pour la production des aliments représente un vrai progrès.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE APPRECIATION OF SANITARY AND TOXICOLOGICAL ASPECTS OF THE USE OF ENZYMES

Enzymes are often obtained from filtrates of microorganism cultures, in which the formation, at the same time, of toxic substances (mycotoxins) is not excluded. There are microorganisms which are, first and foremost, utilizable producers of enzymes, for example the non-pathogenic and non-toxic cultures of *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. Other groups like the one of *Aspergillus flavus* have a strong tendency to form toxins.

Special attention must be given to the control of purity of the enzymatic preparations, which must not contain any pathogenic microorganism or doubtful residue resulting from the use of products of precipitation or clarification or other substances likely to be harmful to health. They must be free from heavy toxic metals such as : As, Pb, Zn and Cu which can only be tolerated within the legally prescribed limits.

In the opinion of the F. A. O./W. H. O. Committee, enzymatic preparations intended for the manufacture of foods constitute additives. Most countries are in agreement with this conception. In the German Democratic Republic of, these preparations are declared « additives » and at the same time « foreign substances » according to the definitions of § 4 of the Law on Foods. They are, consequently, subject to special conditions of admission.

Besides the proof of technological utility of the enzymatic preparation which should constitute real progress within the general framework of nutrition, it is necessary to guarantee safety in respect of alimentary and toxicological hygien *i. e.* proof of absence of health danger must be supplied, statistically. The necessary data are the result of examples of acceptability and toxicity based on the fundamental regulations of toxicological examination of additives. The data are discussed in greater detail in the report which deals, notably, with the possibility of later damage. Man can only be used to test these essays if the possibilities of direct toxic manifestations can be excluded, and if the appearance of long term damage is unlikely and if experimentation on animals has given positive results.

In case of doubt, foods manufactured using enzymes must be subjected to toxicological examinations. On condition that safety measures are complied with, the use of enzymes for the production of foods represents real progress.

LITERATUR

(1) Mollenhauer H. P., 1965. *Ernährungswirtschaft*, **12**, 384, 386, 388, 390.

(2) Mateles R. I., G. N. Wogan (Édit.) 1967. : *Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins*, Cambridge u. London : The M. I. T. Press.

(3) Czok G., 1968. *Medizin u. Ernährung*, **9**, 57-61.
(4) Bär F., 1966. *Medizin u. Ernährung*, **7**, 180-183, 202-206.
(5) Maganova N. B., 1968. *Voprosy pitanija*, **27**, 67-72.
(6) Fritz W., Engst R., U. R. Donath : *Die Nahrung*, 16, z. Z. im Druck.
(7) Tschiersch B., 1966. *Pharmazie*, **23**, 445-457.
(8) Marquardt I. P., 1967. *Das öffentliche Gesundheitswesen*, **29**, 169-182.
(9) Lang K., 1957/58. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.*, **232**, 48-66.
(10) *Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen.* vom. 30-11-1962, GBl. I. D. D. R. S. 111.
(11) *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.*, **144** (1958).
Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser., **348** (1967).
(12) Lewerenz H.-J. Unveröffentlichtes Manuskript.
(13) Djubjuk N. E., Bogorodickaja V. P., Maganova N. B., 1968. *Voprosy pitanija*, **27**, 42-46.
Bogorodickaja V. P., Djubjuk N. E., 1965. *Voprosy pitanija* **24**, 9-13.
(14) Maganova N. B., 1968. *Voprosy pitanija*, **27**, 38-42.
(15) Eichholtz T., 1956. *Die toxische Gesamtsituation auf dem Gebiet der menschlichen Ernährung.* Berlin, Göttingen, Heidelberg : Springer-Verlag.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 629-633.

ANWENDBARKEIT ENZYMATISCHER ANALYSEN-METHODEN IN DER LEBENSMITTELCHEMIE

Dr REHKAEMPER

Boehringer — Mannheim (R. F. A.)

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. weist auf die Anwendbarkeit enzymatischer Methoden in der Lebensmittelanalyse hin und führt die Vorteile dieser Methoden gegenüber anderen Methoden an. Es werden Substanzen, welche enzymatisch in einzelnen Lebensmitteln bestimmt werden können aufgezählt, sowie die Probevorbereitung und die Durchführung der enzymatischen Analyse beschrieben.

EINLEITUNG

Obwohl Enzymaktivitätsbestimmungen in der Lebensmittelchemie seit langem bekannt und angewandt werden — siehe Enzymbestimmungen in der Milch zur Feststellung einer ausreichenden Erhitzung oder der Diastase-Bestimmungen im Honig zur Qualitätskontrolle — haben wir die weniger bekannten Bestimmungen aufgegriffen, nämlich die Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen mit Hilfe von Enzymen. Unter die Lebensmittelinhaltsstoffe, die wir enzymatisch bestimmen können, fallen Mono- und Disaccharide, Äthanol, Glycerin, Sorbit, organische Säuren und Aminosäuren.

Der Vorteil der enzymatischen Analyse ist besonders bei Nahrungsmitteln gegeben. Es gibt kein anderes Probenmaterial, das so heterogen in seiner Zusammensetzung ist, wie gerade die Nahrungsmittel. Aus diesem Substanzgemisch kann ohne vorherige Isolierung oder Auftrennung mit Hilfe des enzymatischen Analyse eine Substanz spezifisch bestimmt werden. Besonders vorteilhaft ist die enzymatische Zuckeranalyse, wo genau zwischen den einzelnen Zuckern differenziert werden kann, wie es chemisch nicht möglich ist.

Natürlich hat die enzymatische Analyse auch ihre Grenzen. Die Grenzen sind gegebene durch die Enzyme, die uns zur Verfügung stehen. Wenn man nach Sachgebieten aufgliedert, so kann man :

1. Bei Fleisch- und Wurstwaren folgende Substanzen enzymatisch bestimmen : Creatin und Creatinphosphat un Kürze auch Creatinin-Glutamat, Lactose, Stärke, Pyrophosphat und Phosphat und Gluconat.

2. Bei Zucker- und Süsswaren : Glucose, Fructose, Saccharose, Galactose, Lactose, Mannose, Maltose, Raffinose, Stärke, Sorbit, Äthanol, Gluconsäurelacton (z. B. in Backtriebmitteln).

3. Bei alkoholischen und nicht alkoholischen Getränken : D- und L-Milchsäure, L-Äpfelsäure, Gluconsäure, Essigsäure, Zotronensäure, Brenztraubensäure, Oxalessigsäure usw., Glycerin, Glucose, Fructose, Saccharose, Äthanol, Sorbit.

4. Für Gemüsekonserven gilt das unter Punkt 3 gesagt.

5. Für Molkerei-Erseugnisse
kommen folgende Bestimmungen in Betracht :
Lactose, D- und L-Milchsaeure, Citronensäure, Pyrophosphat.

6. Sehr nützlich ist die enzymatische Bestimmung bei diätetischen Lebensmitteln. Quantitativ können nebeneinander bestimmt werden :
Glucose, Maltose, Saccharose, Galactose, Lactose, Fructose, Sorbit und Stärke.

Ferner lassen sich noch die Aminosäuren Asparaginsäure, Asparagin und Arginin bestimmen.

PROBENVORBEREITUNG

Für die enzymatische Analyse muss die zu bestimmende Substanz in wässriger Lösung vorliegen. Das ist bei Getränken wie Wein oder Bier kein Problem. Anders liegt der Fall bei Suspensionen *z.* B. Milch oder festen Proben *z.* B. Schokolade.

Bei festen Proben muss die zu bestimmende Substanz mit Wasser extrahiert werden. Am günstigsten ist eine Extraktion im Wasserbad bei 60-70°C mit einer max. Dauer von 30 mn Eine Temperatur von 60-70°C ist erforderlich, um bei fetthaltigen Lebensmitteln ein Schmelzen des Fettes zu erreichen und so die Inhaltsstoffe besser zu extrahieren können. Wir empfehlen immer die Extraktion im Verhältnis 1 : 100 vorzunehmen. Bei diesem Verhältnis braucht das unlösliche nicht zu berücksichtigt werden. Dies geht aber nur, wenn die zu bestimmende Substanz in ausreichender Menge vorliegt.

Im allgemeinen kann man sagen, dass die enzymatische Methode gestattet, bis zu 0,1 µMol/ml Probelösung zu bestimmen. Bei einer Extraktion 1 : 100 müssten also 10 µMol Substanz in 1 g Untersuchungsmaterial vorliegen.

Was geschieht nun weiter mit der Probenlösung nach erfolgter Extraktion? Bei nicht fetthaltigem Probenmaterial lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und füllt auf 100 ml mit Wasser auf und filtriert anschliessend. Bei fetthaltigen Proben lässt man zur besseren Filtrierbarkeit die Probenlösung im Eisbad oder Kühlschrank abkühlen, damit sich das Fett abscheiden kann und filtriert anschliessend.

Eine leichte Trübung oder Verfärbung der Probenlösung stört nicht. Mit der Farbe wären wir bei Rotweinen und stark gefärbten Fruchtsäften. Wie steh t

es damit? Anthozyane haben die Eigenschaft mit dem pH-Wert ihre Farbe zu ändern Ausserdem fallen die Farbstoffe im stark alkalischen Bereich aus. Wie ich später noch ausführen werde, sind wir bei einigen Bestimmungen gezwungen, bei pH = 9,0 die enzymatische Bestimmung durchzuführen. Trübungen, die durch das Ausfallen des Farbstoffes entstehen, können wir aber bei der enzymatischen Analyse, deren Messprinzip dic photometrische Messung ist, nicht gebrauchen. Bei stark gefärbten Probenlösungen, bei denen mit einem Farbumschlag und einem Ausfallen zu rechnen ist, muss vorher entfärbt werden. Das beste Adsorptionsmittel für Gerbstoffe und Naturfarbstoffe ist Polyamid.

Wir entfärbten im batch, indem wir der Probelösung maximal 5 p. 100 Polyamid zusetzen, kurz umschütteln und filtrieren. Da auch organische Säuren an Polyamid gebunden werden, wenn auch nicht so leicht wie Gerbstoffe und Anthozyane, empfiehlt es sich, die Probenlösung vorher zu neutralisieren, und die Polyamidmenge so niedrig als möglich zu halten. Es muss jedoch betont werden, dass die Probenlösung nur dann entfärbt werden muss, wenn sie unverdünnt zum enzymatischen Test eingesetzt wird. Das gilt z. B. für die Bestimmung von D- und L-Milchsäure und Citronensäure im Wein.

Eine Behandlung mit Polyamid ist ebenfalls angezeigt, wenn der Gerbstoffgehalt der Probenlösung grösser als 0,5 g/l ist. Gerbstoffe stellen nämlich für die Dehydrogenasen, unsere Indikatorenzyme, Hemmstoffe dar. Das Problem derInhibitoren wird später noch kurz behandelt werden. Wir haben nun die Probenvorbereitung bei Flüssigkeiten und festen Stoffen gehört. Wie steht es nun bei Suspensionen wie Milch und stark eiweisshaltigen Probenmaterial. Hier empfiehlt es sich eine Enteiweissung vorzunehmen. Bei Suspensionen empfehlen wir eine Enteiweissung mit 1 N Perchlorsäure im Verhältnis 1 : 1. Bei festen Proben, wie Milchpulver, Wurst, Fleisch usw. eine Enteiweissung im Verhältnis 1 : 5 mit 0,4 N Perchlorsäure, wobei die Enteiweissung bei kompakten Proben wie z. B.

Wurst in einem Zerkleinerungsgerät, in einem Mixer vorgenommen werden sollte, wo in einem Arbeitsgang zerkleinert, enteiweisst und extrahiert wird. Nach der Enteiweissung sollte, besonders wenn Di- oder Polysaccharide bestimmt werden, sofort zentrifugiert oder filtriert werden. Vom Überstand oder Filtrat wird ein aliquoter Teil sofort zur Vermeidung der Hydrolyse der Zucker neutralisiert. Wir empfehlen eine Neutralisation mit 2 N KOH. Dies hat den Vorteil, dass unser Enteiweissungsmittel, die Perchlorsäure, als Kaliumperchlorat ausgefällt wird. Die Neutralisation sollte in der Kalte vorgenommen werden, damit das Kaliumperchlorat vollständig ausfällt und keine Nachtrübungen entstehen. Nachdem nun die Probenvorbereitung behandelt wurde, sollte dabei noch folgendes behandelt werden :

Die Enzyme sind sehr empfindlich gegen Schwermetallionen und hohe Salzkonzentrationen, wobei die Hemmbarkeit bei den einzelnen Enzymen sehr verschieden ist. Da aber bei vielen Bestimmungen nicht nur ein Enzym eingesetzt wird, sondern ein Enzymgemisch aus verschiedenen Enzymen, sollte man sich allgemein zur Regel machen : Reagenslösungen und Probenlösungen nur mit destilliertem Wasser herstellen, möglichst aus einer Glasapparatur, damit keine Metallspuren im Wasser enthalten sind. Entionisiertes Wasser ist nicht immer ganz frei von organischen Verunreinigungen und Mikroorganismen und sollte daher nicht verwendet werden. Bewährt hat sich die Destillation von entionisierten Wasser. Ein Zusatz von Äthylendiamin-tetræssigsäeure zur Ausschaltung der Metallspuren ist nicht immer

möglich, da viele Enzyme bestimmte Kationen wie Mg und Zn zur Aktivierung brauchen.

Wie ist es nun möglich festzustellen, ob in der Probenlösung Inhibitoren vorhanden sind, welche die enzymatische Bestimmung stören. Da gibt es zwei Möglichkeiten :

1. Ein Zusatz von Reinsubstanz zur Probenlösung. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen kann dieser Zusatz nicht wiedergefunden werden.
2. Die Prüfung auf Proportionalität. Es werden zwei verschiedene Mengen an Probelösung zum Test eingesetzt z. B. 0,1 ml und 0,2 ml. Es müsste bei 0,2 ml Probelösung die doppelte Menge gefunden werden.

Ist das nicht der Fall, so befindet sich in der Probelösung ein Hemmstoff.

Wie kann man nun den Hemmstoff beseitigen? In den meisten Fällen genügt ein Zusatz von Polyamid oder EDTAV. SO_2, das ebenfalls als. Inhibitor auftreten kann, muss sofern möglich, abdestilliert werden, oder durch einen Überschuss, an Acetaldehyd gebunden werden.

DURCHFÜHRUNG EINER ENZYMATISCHEN ANALYSE

Die Durchführung einer enzymatischen Analyse ist denkbar einfach. Man benötigt dazu, ausser den biochemischen Reagentien nur ein Photometer, das es gestattet, im UV-Bereich zu messen, einfache Glasküvetten und Enzym-Testpipetten mit lang ausgezogener Spitze. Sonstige Geräte sind nicht erforderlich. Die Enzyme katalyzieren chemische Reaktionen und da von den Substanzen nur kleine Mengen gebraucht werden und keine extremen Temperaturen angewendet werden müssen kann die Reaktion meistens in der Küvette erfolgen. Das ist das Verblüffende an der enzymatischen Analyse und das einzig Ungewohnte für einen Vollchemiker, der es gerne kochen, dampfen sieht. In die Küvette werden pipettiert eine Pufferlösung, denn jedes Enzym hat sein spezielles pH-Optimum, das während der Reaktion eingehalten werden muss, die Probelösung und die Cœnzymlösung. Nach dem Mischen wird die Grundextinktion abgelesen. Danach wird die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet. Die Reaktion wird solange photometrisch verfolgt, bis keine weitere Extinktionsänderung den Stillstand der Reaktion anzeigt. Darauf wird die Extinktionsdifferenz zur Anfangsextinktion gebildet und dieser Wert geht in die Berechnung ein.

Die Berechnung erfolgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz :

$$\log I_0/\log I = E = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

aufgelöst nach der Konzentration der gesuchten Substanz ergibt sich

$$c = \frac{E}{d \cdot \varepsilon}$$

Da man nicht mit molaren Konzentrationen arbeitet, muss das Probevolumen und das Gesamtvolumen noch in die Formel eingehen.

Man erhält :

$$c = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot \varepsilon \cdot v}$$

Der Extinktionskoeffizient der Coenzyme NADH und NADPH beträgt bei

$$340 \text{ nm } \varepsilon = 6{,}22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$$

bei Filterphotometern kann man bei

$$334 \text{ nm } \varepsilon = 6{,}0 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$$

und

$$366 \text{ nm } \varepsilon = 3{,}3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$$

messen.

Eingesetzt in die Formel erhält man dann die Konzentration in Mol. Zur Umrechnung in g muss noch mit dem Molekulargewicht der betreffenden Substanz multipliziert werden.

Hat man Reinsubstanzen zur Hand, kann man diese auch als Standard mitführen. Die zu bestimmende Substanz kann dann über den Standard berechnet werden. Die Formel vereinfacht sich dann wie folgt.

$$\frac{\Delta E_{\text{Probe}} \cdot c_{\text{Standard}} \text{ (mg/ml)}}{\Delta E_{\text{Standard}}} = c_{\text{Probe}} \text{ (mg/ml)}$$

RÉSUMÉ

APPLICATION DE MÉTHODES ENZYMATIQUES POUR L'ANALYSE ALIMENTAIRE

L'auteur indique les possibilités d'application de méthodes enzymatiques pour l'analyse alimentaire et explique les avantages en comparant avec d'autres méthodes analytiques. Il énumère des substances susceptibles d'être déterminées dans les différents aliments par méthode enzymatique, la préparation des échantillons et l'exécution de l'analyse enzymatique.

SUMMARY

APPLICABILITY OF ENZYMIC METHODS IN THE CHEMISTRY OF FOODSTUFFS

The author points out the applicability of enzymic methods in the analysis of foodstuffs and states the advantages of such assays when compared to other analytical methods. The substances that can be determined by means of enzymic methods in various foodstuffs are enumerated and the preparation of samples and the analytical procedure described.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 635-645.

REGULATION OF ENZYMES

Laurence I. WOOD, Esq. President,
A. WEITZMAN, Esq. KENNEDY* and LEIGHTON*

The Food and Drug Law Institute,
1750 Pennsylvania Avenue, NW.
Washington D. C. 20006 (U. S. A.)

** 888 17th street, N. W.*
Washington, D. C. 20006.

SUMMARY

The regulation of enzymes used by the food industry is most complex because, though enzymes are considered a single class of chemical organic catalyst, the regulation of enzymes is based on source, usage, familiarity and residual level in the food.

This paper therefore examines a categorization system for enzymes for purposes of regulation. To the extent possible, it makes reference to the specific use of enzymes discussed in the individual reports already presented at this meeting.

The specific areas of the law of the different countries applicable to enzymes and enzyme usage are those relating to the control of food processing, food additives and food contamination.

This report covers the laws of the United States and Europe. In the United States, our Food and Drug Administration has recently issued new rules setting forth criteria for classification of all processing chemicals as either « additives », in which case they must not be used until tested and a specific regulation issued on its use, or not as « additives », in which case use is unregulated.

The report then compares this approach to the diverse approaches to enzyme regulation in Europe and approaches being taken by the *Codex Alimentarius* Commission.

GENERALITIES

I am honored indeed to be here today speaking before this distinguished assemblage on the subject of « The Regulation of the Use of Enzymes ». Actually, coming as a layman to talk to you on such a technical subject, after all the erudition and knowledge and learning that have been spread before you these past few days, indicates very clearly that I have a real problem, or challenge, or opportunity. In any event, the subject is certainly real, important, and timely.

Interest in the regulation of the use of enzymes in food is justified especially today in view of the present world-wide consumer movement. The use of foods (containing additives) is being challenged in large part because of a misunderstanding of the chemical nature of foods and the chemical nature of man.

The subject matter of this report is « the legal regulation of enzymes ». Before considering this topic, let us seek to identify and define that class of products on the basis of their composition, specification, impurities, and functional use in food. Then, we will identify the public policy principles of food law which are of concern to us, and the particular food law regulations which are the means of achieving the public policy goals as they apply to the regulation of enzymes.

To summarize some of what we have learned — and this review is relevant because of the relationship between the nature of the enzyme and the peculiar problems bearing on its regulation — enzymes are complex proteins originating from living cells and capable of catalyzing or accelerating chemical changes without themselves undergoing marked destruction in the process. As high molecular weight proteins, they are composed of a chain of amino acids, the order of which is known as the primary configuration. In addition, enzymes have a secondary and tertiary configuration which describes their three dimensional shape when they are in active or inactive condition. It is the particular configuration in the active state that makes the enzyme highly specific as to the point at which it acts, namely, the particular bonds between complex carbohydrates, fats, or other proteins.

Enzyme preparations used in processing are not usually chemically pure. Rather, we use extracts from the tissue in which the enzyme occurs or the actual living organism ; for example, bacteria and molds which produce enzymes. Increasingly, we are isolating special strains of bacteria — mutants — which exaggerate a particular enzymatic activity. Consequently, when dealing with enzyme preparations, we are dealing with other substances from living cells, and, in the case of bacteria, possibly undesired toxins which present the major safety problem. In addition, many enzyme preparations are complex mixtures of several enzymes, not a single chemical compound.

The use of an enzyme must also be considered in determining how it is to be regulated. Some enzymes as used become actual components of the product ; for example, the molds in cheese and yeast in bread. Other enzymes are added to a product to perform a functional use, but are removed before the product is packaged ; for example, fermenting enzymes in alcoholic beverages, or beer, and enzymes used to clarify fruit juice. In some of these cases, the enzyme actually gives the product a unique character, while in other cases it is only a functional catalyst which has no importance after the product processed.

FOOD LAW APPLIED TO ENZYMES

The fundamental goal of food law in all countries is to promote honest trade and to protect the health and safety of consumers. The manner in which a country's food laws apply these principles to regulate enzymes frequently depends on whether

enzymes fall within the legal definition of « food » or « additives to food », or are regarded as a « contaminant ». The lay concept of what is a « food » — and even the technical concept — are not necessarily the criteria used by legislatures in defining « food » for regulatory purposes. Rather, most definitions are drawn in such a way as to include products which the legislature has determined « should be regulated ». In addition, some countries have a special definition for « food additive ». To be logical about it, a food additive should mean any substance added to food for a functional purpose.

In the United States, « food » is defined simply as « articles used for food or drink, chewing gum and articles used for components of such articles ». According to this definition, « food » would include enzymes either naturally occuring in it (enzymes in animal or vegetable tissue), or enzymes used for « components » of food — ingredients added to comprise the food — (for example, the yeast in bread) ; however, an enzyme extract in itself is not a food since it is not used as a food or drink.

Our law, in order to protect the integrity of food and to promote honesty in trade and fair dealing with consumers, authorizes the promulgation of « standards of identity » which specify compositional requirements. An enzyme could be a mandatory ingredient of a standardized food if it were an essential and expected component of the food. The law's labeling requirements also specify that ingredients of compound foods must be listed on the label unless the food is a standardized food, in which case only optional ingredients designated by the regulatory authority must be listed if doing so promotes honesty and fair dealing. Generally speaking, in non-standardized foods, the presence of enzyme ingredients would have to be declared ; but a residue of a functional enzyme intended to be removed after processing would not.

In the United States, the government seeks to guard safety and health through the use of food adulteration laws, which prohibit the contamination of food, thereby regulating undesirable substances which may enter a « food ». Our original 1906 Pure Food Law defined an adulterated food as food to which « any... poisonous or other... deleterious ingredient which may render such article injurious to health » has been added. This law, however, did not completely cover all substances in food. As it was written, it would have dealt only with added ingredients. Yet many toxic substances are indigenous to the food, though present in limited quantity. In addition, an ingredient of compound foods of established identities was considered by the courts not to be an « added » ingredient. Further, the government had to prove that the added ingredient was injurious ; this was often difficult because the injury caused by some ingredients was cumulative over long periods of time, and the injurious ingredient would be difficult to identify.

To remedy this, the law was changed in 1938 to cover any poisonous or deleterious « substance » contained in the food, whether naturally occuring or added. According to the new law, foods containing indigenous toxins could be used so long as the quantity of toxin in such food did not ordinarily render the food injurious to health. Poisonous or deleterious substances could not be added unless a tolerance was established which took into consideration the use of the added substance in the entire food supply. In addition, there had to be a showing that the substance was required in production or could not be avoided in good manufacturing practice.

Thus, the 1938 law encompassed all substances in food, including residues not removed from the food during processing. Since the law ignored the methodor manner in which a substance entered a food, a substance was regulated if it was poisonous or deleterious ; the burden of proof remained on the government.

Twenty years later, the law was again changed to partially eliminate the burden on government of showing that an added substance was poisonous or deleterious. This new law — known as the « Food Additive Amendments of 1958 » — established several classes of added substances, some of which had to be precleared before use. Those substances which were required to be precleared were defined as « food additives ».

The term « food additive », according to the statute, means : « ... any substance the intended use of which results or may reasonably be expected to result, directly or indirectly, in its becoming a component or otherwise affecting the characteristics of any food (including any substance intended for use in producing, manufacturing, packing, processing, preparing, treating, packaging, transporting, or holdingfood ; and including any source of radiation intended for any such use) ; if such substance is not generally recognized, among experts qualified by scientific training and experience to evaluate its safety, as having been adequately shown through scientific procedures (or, in the case of a substance used in food prior to January 1, 1958, through either scientific procedures or experience based on common use in food) to be safe under the conditions of its intended use... ».

Permit me to try to simplify this definition for purposes of our discussion : the term « food additive », subject to exemptions, covers any additive including enzymes intentionally and directly added to food, which additive is potentially unsafe under actual conditions of use. « Potentially » is used here to connote uncertainty, because of lack of familiarity with the additive. In addition, the definition covers a substance indirectly added to a food (during its processing or preparation), which may reasonably be expected to become a component of the food. Thus, the term includes both characterizing and functional additives, and even those functional additives which are intended to be removed in processing but are not completely removed.

Eliminated from this definition, and consequently from the food additive preclearance requirements, were substances « generally recognized as safe » (GRAS). Whether a substance is GRAS is scientifically determined (as provided in the definition) by experts qualified in evaluating the safety of the additive. Separately exempted are pesticide residues and color additives, which are covered under other provisions of this law, and substances approved by the regulators prior to 1958.

In addition, the amendment provides that no food additive regulation may be issued if the additive produces cancer when ingested by man or animal or if it is found after tests « appropriate for the evaluation of safety » to produce cancer. This is the highly controversial « Delaney Clause ».

There have been several regulations published interpreting and applying the additive amendment. A most important regulation is the so-called « GRAS list », which has become a controversial subject. The GRAS list was the creation of the Food and Drug Administration (F. D. A.) as the response to a deluge of requests for information about chemicals frequently added to food, and as to which of these chemicals were within the statutory legalistic definition of « food additive ». The

GRAS list reflects the opinion of the Food and Drug Administration as to which substances were « generally recognized as safe » based on information in its possession and on opinions solicited from scientists. The law, however, did not appoint the F. D. A. as final arbitor of GRAS status. It left that determiniation to the scientific community qualified to determine the safety of the particular additive. Therefore, the list itself does not in theory have binding or final legal effect.

The GRAS list substances are now being reviewed, in response to the cyclamate incident, along with all substances added to food. As part of this reevaluation of scientific data and experience on all substances in food, the F. D. A. published a regulation stating that it would make a determination of which products are GRAS and publish these findings. This regulation also states that some substances which are GRAS will not have to be listed on the revised list. Those substances include all « food of natural biological origin » that has been widely consumed for its nutrient properties prior to 1958 without detrimental effect when used under reasonably anticipated patterns of consumption.

In applying this provision to enzymes, it would seem that « food » containing enzymes as components could be included in this last category, even though the food and not the enzyme is consumed for its nutrient properties. In addition, the statute provides that such a food « modified by conventional processing as practiced prior to January 1, 1958 » is also GRAS. Since enzyme fermentation may be considered processing, it is at least arguable that foods treated with enzymes, perhaps even though some enzyme residue is in the final product, will not have to be listed. Whether the enzyme itself must be listed is another matter.

The overriding legal question is, of course, whether the final list is of binding legal effect. Many food lawyers have argued that the list is a statement of the F. D. A's opinion and that the statute puts the burden of judgment not alone on the F. D. A., but on all scientists qualified to evaluate the safety of a particular article.

However, if a food processor determines that his enzyme or modified food does not have to be listed, or if he disagrees with an opinion of the F. D. A., he should be certain of his own safety evaluation of the enzyme and that he has exercised reasonable business judgment as to whether to consult the agency or not. If he does consult the agency, he risks obtaining a conservative answer, namely, that he must be listed. For some regulators will not risk assuming the burden of advising against listing when in the future another « cyclamate incident » might occur. I therefore recommend evaluation of each problem by technical and legal counsel first, in order to isolate the problem and reach a well thought out position.

ACTIVITIES OF CODEX ALIMENTARIUS

As you all know, there has been established an international *Codex Alimentarius* Commission, which is working to harmonize product standards and also to evaluate the safety of many food additives. Both of these efforts are being undertaken in regard to enzymes.

Although the working Codex definition of « food » adopted in November of 1966

is not intended to be a model for legislation, it does set forth the scope of the subject matter for Codex's work. « Food », according to this definition, means any substance, whether processed, semiprocessed, or raw, which is intended for human consumption, and includes drink, chewing gum and any substance which has been used in the manufacture, preparation or treatment of food, but does not include cosmetics or tobacco or substances used only as drugs. Though this definition may be considered inartistic, it does encompass all food additives or contaminants which may enter food, and, were this definition given statutory effect, it would form a basis for asserting legislative and regulatory jurisdiction over all components or substances in food.

A definition for « food additive » was proposed in 1965 which stated that food additive means any substance, not being a food *per se*, the intended use of which results, directly or indirectly, in it or its by-products becoming a component of food. The term includes any substance intended for use in producing, manufacturing, packing, processing, preparing, treating, packaging, transporting, or holding food. If this definition and the above definition for food were adopted by any legislature, there would be adequate authority to fully regulate enzymes.

Enzymes individually have received great attention from the Codex Committee on Food Additives. The Committee has published an index to additives with a list of enzyme preparations derived from animal, plant and microbe sources and limitations on use. Use of these enzymes would have been in accordance with the proposed General Principles for the Use of Food Additives. In addition, there was the Proposed Draft General Standard for Commercial Enzyme Preparation for Food Processing. The framework of this standard, established two categories of commercial enzyme preparations : preparations or components thereof which may be consumed with the finished foot product, and preparations or components which « are not intended to become part of the finished food product ». The standard contained a description of the preparations in general terms, essential composition and quality factors, permitted additives and ingredients, contaminants, and specifications on hygiene. The standard would have required the name of the enzyme preparation to be declared as part of the List of Ingredients. This standard specifically added that the name of the enzyme preparation would be declared. I assume this means that a functional description in the ingredients clause will no longer suffice. This is a deviation from the established policy permitting functional listing — yet no reasons are given for such a change. The standard has not been adopted.

This standard was not a typical food standard, but mostly what might be called a set of « good manufacturing practices ». Consequently, the title « Code of Practice » most aptly applies.

Included at the end of this paper is a summary of the scheme of regulation of enzymes as I understand the laws of various countries. One difficulty in making a determination of how enzymes are regulated (whether they be foods, foodstuffs, foreign substances, familiar substances, or food additives) is the wideranging set of definitions in the different food laws which have no resemblance to one another. Consequently, not only do I warn you that you should not place total reliance on my interpretations here, but I remind you also that in working on projects such as *Codex Alimentarius* and Common Market unification of laws, it is most important that there be enacted some basic definitions which can be accepted by all.

RECOMMENDED PROCEDURE

It is therefore my proposal and my conclusion that no matter what scheme or method of regulation is decided upon, it is essential that basic definitions be sought, not to implement any scheme of regulation, but rather to describe the total area, including those areas of subject matter which may not need any regulation.

In a separate part of the law, there should be a full and clear description of which substances fall within the basic definitions and are regulated through a positive list, and which substances, for example, are prohibited if they are found to be unsafe. In this way, harmonization of food law and our task of complying with each country's food law will be easier, when we are able to comprehend more exactly the requirements of these laws. In addition, in this way, points of disagreement as to the manner of regulation can be made clear, and work to eliminate disagreements could focus on the isolated point. With a logical approach to the issues thus made feasible, it should be possible to achieve solutions based on scientific and legal reasoning, rather than on prejudice and fear.

Speaking of prejudice and fear, I am constrained to add a final note on certain recent developments in the United States. Within the past few days, there has been publicity about recently proposed legislation to amend the U. S. food law. This bill would require manufacturers of « additives » to prove that each additive is not only « safe » but « effective » and « necessary ». This would not simply bring our food law into line with our drug law but would add a new requirement of « necessity ».

Since 1962, the law has required drugs to be proven effective. Drug manufacturers are required to present substantial evidence of effectiveness before a new drug can be approved.

Under current food law, *effectiveness* of a food additive is required, and no new additive is permitted by F. D. A. unless it accomplishes its stated purpose. Moreover, as a practical matter, no manufacturer would use an additive if it were ineffective, since the use of an ineffective additive would simply uselessly raise the cost of the final product.

The danger in the proposed food legislation is its totally negative approach to the whole additive question. The basic attitude is the apparently arbitrary assumption of potential risk without due consideration of the potential and actual benefits in additives. This is evidenced by the reported stated goal of limiting the number of different additives used in food.

As in the evaluation of safety, there is a measurement of benefit and risk ; so, too, in the evaluation of effectiveness and necessity, there may be a measuring of comparative values. If « effectiveness » and « necessity » are given comparative connotation, then no additive can be introduced unless it is « better » than an existing additive. Such a requirement for food additives would limit competition between substances of relatively equal usefulness and could ultimately resolve to « the » one best substance. This « monopoly » could enable one manufacturer to corner the market. It could also create great economic hazards, for if a « better » substance is found, then the old additive would no longer be permitted to be used. What is « necessary » is such an ambiguous legal test that it should not even be contemplated. For example,

preservatives are not necessary when a food is prepared at home from fresh constituents and eaten soon after. However, if it is not to be eaten for weeks, some method of preservation should be used.

Unfortunately, those who are well meaning in introducing this legislation lose sight of the reasons we use food additives — the benefits! What are those benefits? Well, for one, many products could not be made without additives. In addition many products would otherwise be unavailable because they deteriorate in storage. This may not be important in an economy which rapidly services its populace in a confined area and where the turnover of goods is rapid. But resistance to deterioration in an economy which sells products across thousands of miles is important.

The chief benefit of additives, however, should be broadcast and widely understood, especially in this period of inflation and recession : it is the fact that the use of additives makes possible reductions in the costs of producing products. If we apply a « test of necessity » based on these economic considerations, then additives are necessary.

Let us realize the importance of striving to improve the food supply so there will be, for once, enough for all of us! Additives have demonstrated their usefulness on this vital front. It simply does not make sense to be a romantic and say, « Let's turn the clock back to the way we produced food in the good old days ». Time has changed many things, although we may not like it or understand it. Scaring the consuming public, which understands these changes even less, will not solve the great problems we face. Labeling safe products as « public enemies » because of a hypothetical hazard, and controlling life on the basis of the hypothetical hazard, is nonsense, when to do so stands squarely in the way of human and scientific progress.

CONCLUSION

Let me conclude with this warning. When we are challenged in the future by laws such as the one proposed, let us not, as scientists or lawyers, speak with the beguiling certainty of those who advocate restriction. For to use « certainty » in this sense is to distort the truth, to exaggerate and to present the public with false or distorted « facts ». As honest men we know that there is no « fact » in this complex area, only probability. Accordingly, we must not do more than state our case in those terms. This honesty of the scientific community will be a handicap on the political front, for there it is tempting, and often effective, to deal only in absolutes — only in blacks or whites — « This food is all safe » — « That additive is unsafe ».

Unfortunately, life is not and cannot be that simple. If we and our society are to grow, to mature, to improve our food supply and to enrich the lives and bodies of our millions and millions of people, then we must strive to improve, to progress, and to grow. To do so will inevitably mean that the « dogmas of the quiet past » may be found wanting as we move into new scientific and technological areas. To progress, we must experiment; to grow, we must improve. Let us not stultify tomorrow with the ignorance of yesterday. Let us be worthy of the challenge which the future demands.

National Legislation

To round out our discussion, I planned a summary of the regulatory scheme of a number of representative countries. Unfortunately, there is no single book with all the basic food laws of all countries. Most unfortunately, the FAO/WHO publication which published the food laws of different countries as they were amended has been discontinued. Therefore, this discussion is not based on what is properly current primary authority. I make this point since it is most impossible to deal with our international legal problems unless we are all well informed. In addition, it is important to have the national food legislation of all countries available to all who are working with *Codex Alimentarius*, or the European Economic Community, so that we may endeavor to harmonize the laws based on common principles and policy objectives. Consequently, the accuracy of this summary should not be relied on without consulting the particular countries' laws as well.

The German government is currently in the midst of changing the scope of their positive list system. The new law will have a definition for food additive (« Zusatzstoff ») to replace the concept of « foreign substance » (« Fremdstoff ») which did not include enzymes. Under the new law all additives will have to be listed. However, it is reported that this new definition will also not include enzymes. Just how the mechanism of excluding enzymes will work I do not know.

Sweden places all additives to foodstuffs under the same control authority as foodstuffs. « Additives » are substances not contained in the raw material of the foodstuff, but are added to modify the color, taste, or stability or for any similar purpose, and remain in the foodstuff in final form. If the enzyme preparation meets the requirements of this definition, it must be listed before being permitted in the food. Here the definition appears to include both Codex Category I and Category II enzymes. The Swedish Board of Trade annually publishes a list of enzymes which may be used.

In the United Kingdom the regulation of the use of enzymes outside of standardized products appears to be based on the principles of abuse set forth in the adulteration provisions of the Food and Drugs Act. Enzymes are included within the definition of « food » which encompasses all ingredients in the preparation of food and drink. Arguably, Codex Category II enzymes are not included in the definition but they would be considered as a possible contaminant subject to prohibition if their use adulterates a food.

France has published several special authorizations on the use of a number of enzymes for use by a number of industries. In addition, several special and temporary authorizations have been granted.

Canada has placed plenary authority over food regulation in the country's food regulatory authority. All food additives under the law are generally regulated under the principle of abuse prohibiting poisonous or deleterious substances in food. However, the Canadian directorate lists substances used as food additives on a positive list, including some enzymes. No other enzymes may be used.

The Netherlands regulate enzymes by means of food standards for particular products and a positive list of food additives.

The Belgian law defines food additives as « substances which are not foods

themselves, and which may by their presence within or on foodstuffs have effects independent of their possible nutritive values, independent also of their nutrient content in vitamins and in flavoring and seasoning components ». This definition like the 1906 U. S. law appears to exclude ingredients such as enzymes in established foods. This conclusion is supported by several governmental interpretations.

Switzerland's law states that food additives, foreign substances, must be approved before use. Enzymes are considered as foreign substances within the law.

My single conclusion is that the regulation of enzymes is most complex because the laws of different countries define the terms « food » and « food additive » to either include or exclude a substance rather than determining what substances need to be regulated by means of a positive list or by means of the principle of abuse or making specific legislative declarations to that effect.

RÉSUMÉ

LÉGISLATION CONCERNANT L'EMPLOI DES ENZYMES DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

La législation concernant l'emploi des enzymes dans les industries alimentaires est très complexe pour la raison qu'elle est basée sur l'origine, l'application, les habitudes et le taux résiduaire dans l'alimentation. Et pourtant les enzymes sont considérées comme une seule classe de catalyseurs organiques chimiques.

Cette étude examine en conséquence un système de catégories pour enzymes en vue de la législation. Elle se réfère à l'utilisation spécifique traitée dans les différents rapports présentés à ce Symposium.

Dans les différents pays les domaines spéciaux de loi concernant les enzymes et leur usage sont de trois types : contrôle des procédés technologiques, additifs alimentaires et contamination alimentaire.

L'étude se rapporte aux lois appliquées aux U. S. A. et en Europe. Aux U. S. A. la Food and Drug Administration a récemment édité des lois nouvelles pour tous les produits technologiques chimiques avec une classification selon « additifs », où un contrôle et une législation spécifique sont exigés, ou comme « non additifs », dont l'emploi est interdit.

En conclusion, la législation sur les enzymes aux U. S. A. est comparée avec celle des différents pays d'Europe et à celle de la Commission du *Codex Alimentarius*.

ZUSAMMENFASSUNG

GESETZLICHE REGELUNG DER ENZYMANWENDUNG IN LEBENSMITTELINDUSTRIEN

Die gesetzliche Regelung der in den Lebensmittelindustrien angewandten Enzyme ist äusserst kompliziert, da sie auf Herkunft, Anwendung, Gewohnheit und Rückstandsmenge im Lebensmittel basiert ist, obwohl die Enzyme als eine einzige Klasse chemischer, organischer Katalysatore betrachtet werden.

Es wird eine System von Kategorien für Enzyme hinsichtlich ihrer gesetzlichen Regelung untersucht, das erweiterungsfähig ist und sich mit den insbesondere auf diesem Symposium behandelten Einzelberichten befasst.

Die Kontrolle der Lebensmittelproduktion, der Zusatzstoffe und der Lebensmittelverseuchung sind die Spezifischen Themen der Gesetzgebung der verschiedenen Länder auf dem Enzymgebiet.

Es wird über die Gesetzesvorschriften in den U. S. A. und in Europa berichtet. Die Food and Drug Administration der U. S. A. hat kürzlich neue, strenge Vorschriften zur Klassifizierung aller chemischen Stoffe erlassen :

— als « Zusatzstoffe », wobei sie nur benutzt werden dürfen nach Kontrolle gemäss einer spezifischen Regelung,

— als « Nicht-Zusatzstoffe », wobei keine Anwendungsvorschriften bestehen.

Diese Regelung wird verglichen mit denen verschiedener Enzymvorschriften in Europa und seitens der *Codex Alimentarius* Commission.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 647-650.

L'EMPLOI DES ENZYMES DU POINT DE VUE DE LA LÉGISLATION FRANÇAISE

H. NOILHAN

5 rue Huysmans
78 - Paris 6e

RÉSUMÉ

L'emploi des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires est actuellement régi par la loi du 1er août 1905 sur la Répression des Fraudes et le décret du 15 avril 1912 qui pose le principe de l'autorisation préalable et confie la surveillance au Service de la Répression des Fraudes.

Le décret du 15 octobre 1957 pris en application de la loi du 1er août 1905 réglemente l'emploi des enzymes pectinolytiques dans la fabrication des cidres. Un arrêté du 15 octobre 1957 définit les conditions d'utilisation et de vente des enzymes de clarification il fait notamment obligation d'une déclaration préalable. Un arrêté du 31 juillet 1964 définit les conditions d'emploi des enzymes en biscuiterie.

L'emploi des enzymes coagulantes en fromagerie est réglementé par une circulaire ministérielle du 26 novembre 1967.

En face du développement de l'Industrialisation et de la Commercialisation des enzymes, l'auteur se demande si la réglementation française, déjà ancienne, permettra de contrôler efficacement pendant longtemps l'emploi des enzymes dans les industries alimentaires.

Le développement considérable pris par utilisation des enzymes dans les matières alimentaires sous les formes les plus diverses, contrairement à ce que l'on pourrait croire, n'a pas jusqu'à présent posé en France de problèmes juridiques particuliers.

Bien que cette activité soit devenue très importante et sera appelée d'ailleurs à s'accroître dans les années à venir, les Pouvoirs publics se sont bornés jusqu'à ce jour à utiliser l'appareil législatif existant et tout spécialement la loi du 1er août 1905, sur la Répression des Fraudes. Cette loi, qui punit les tromperies sur la qualité de la marchandise vendue et les falsifications dont celle-ci peut faire l'objet, a été conçue sous une forme suffisamment générale pour qu'elle ait pu s'appliquer, non seulement aux produits en usage lors de sa promulgation, mais encore à tous ceux que l'activité technique et économique a mis dans le commerce depuis lors.

Véritable loi-cadre, conçue comme telle à une époque où cette expression juridico-parlementaire était inconnue, elle a été assortie de nombreux règlements d'Administration publique, qui en précisent le sens et qui ont été promulgués au fur et à mesure que des produits nouveaux ont été mis à la disposition des consommateurs.

C'est ainsi que le décret du 15 avril 1912, pris, précisément en application de la loi du 1er août 1905, a posé en principe qu'aucun produit chimique (conservateurs, antiseptiques, etc.) ne peut être ajouté sans autorisation aux denrées alimentaires. La loi du 1er août 1905, et le décret du 15 avril 1912 sont à la base du système actuel de surveillance et de répression des fraudes et ont été appliqués d'emblée à l'utilisation des enzymes.

LA LÉGISLATION FRANÇAISE CONCERNANT LES ENZYMES

Jusqu'à ce jour les produits, contenant des enzymes ou obtenus par l'action des enzymes, qui ont bénéficié des décrets pris dans l'application de la loi du 1er août 1905 sont peu nombreux.

En matière alimentaire, on doit citer l'arrêté du 15 octobre 1957, autorisant l'emploi des diastases pectinolytiques dans la fabrication des cidres et des poirés et l'arrêté du 31 juillet 1964 autorisant l'emploi d'enzymes dans l'industrie de la biscuiterie, des sirops et des jus de fruits et de légumes.

L'arrêté du 15 octobre 1957 stipule que :

> «est autorisé pour la clarification des cidres et des poirés l'emploi de diastases pectinolytiques pures exemptes de tout produit toxique et antiseptique, de tout germe pathogène et additionnées de substances propres à l'alimentation telles que les sucres et le chlorure de sodium, à l'exclusion d'autres éléments minéraux».

Cet arrêté fait obligation à toute personne se livrant à la fabrication ou à la vente de diastases autorisées à effectuer au Service de la Répression des Fraudes une déclaration indiquant la dénomination de vente et la composition du produit, ainsi que la provenance de la diastase.

Par ailleurs, l'arrêté du 31 juillet 1964 précise l'emploi dans les industries de la biscuiterie, des sirops et des jus de fruits et de légumes, d'enzymes amylolytiques, protéolytiques et pectiques ou de leur mélange provenant de culture microbiennes de *Bacillus subtilis* exempts de tout produit toxique ou antiseptique et additionnés de substances propres à l'alimentation, telles que les sucres et le chlorure de sodium, à l'exclusion de tous autres éléments minéraux.

Les enzymes ou les préparations qui les contiennent doivent être purs du point de vue bactériologique. Comme dans le cas précédent, une déclaration doit être souscrite au Ministère de l'Agriculture, indiquant la dénomination de vente, la composition du produit et la provenance des enzymes.

On notera au passage l'évolution de la terminologie, puisque dans l'arrêté du 15 octobre 1957 il est question de « diastases » et dans l'arrêté du 31 juillet 1964 il n'est question que d' « enzymes », les deux termes étant bien entendu rigoureusement synonymes.

Enfin en ce qui concerne l'utilisation d'enzymes coagulantes en fromagerie, M. le Ministre de l'Agriculture a décidé, par lettre circulaire en date du 26 novembre 1970, d'accorder l'autorisation provisoire en fromagerie pour l'utilisation des enzymes coagulantes suivantes :

— mélange par parties égales de présure et de pepsine de porc ;
— préparation enzymatique dénommée « Sure Curd » ou « Suparen » extraite d'*Endothia parasitica* ;
— préparation enzymatique dénommée « Meite-Noury » extraite de *Mucor pusillus*.

Cette circulaire prescrit que les fabricants de ces préparations enzymatiques devront souscrire au préalable une déclaration au Service de la Répression des Fraudes et par ailleurs que la présence de ces enzymes sera indiquée sur les factures et les bons de livraisons. Mais il ne s'agit là que d'une décision temporaire, la décision définitive ne pouvant intervenir qu'à l'issue d'une période d'essais de deux ans.

Mais étant donné l'extension considérable des applications des enzymes et la publicité parfois tapageuse qui leur est donnée, l'exemple des enzymes dites « gloutones » est typique à cet égard, il est possible qu'une législation spéciale devienne un jour, nécessaire.

LA LÉGISLATION INTERNATIONALE SUR LES ENZYMES

Sur le plan international il ne semble pas que la législation soit beaucoup plus riche que la législation française. En Amérique, comme en France, la fabrication la vente et l'usage des enzymes rentrent dans le cadre des législations antérieures à l'apparition de ces produits sur le marché.

Cependant un travail d'harmonisation s'accomplit à l'heure actuelle à Bruxelles intéressant tous les pays du Marché commun.

Enfin l'adjonction des conservateurs d'enzymes commence à se poser, en raison de l'évolution de la technique, de façon assez pressante.

Les dispositions du décret du 15 avril 1902 seront-elles suffisantes pour assurer la police alimentaire dans cet ordre d'idées ou bien sera-t-il nécessaire d'élaborer une loi nouvelle, c'est ce qu'il est impossible de dire pour l'instant.

CONCLUSION

Quoi qu'il en soit on ne manquera pas d'être frappé par la modicité et l'ancienneté des textes réglementaires régissant cette matière, aboutissant à une efficacité, jusqu'à ce jour, acceptable. Ce qui prouve que lorsqu'un texte législatif est bien fait, ce qui est le cas de la loi du 1er août 1905, il répond d'avance à de multiples besoins et atteint pleinement le but du législateur.

SUMMARY

USE OF ENZYMS AND THE FRENCH REGULATION

The use of enzyms in the agriculture and food industries is actually regulated by the law of august 1st, 1905 about the fraud repression and the Decret of april 15th 1912 which introduce the principle of a previous authorization, the control of which is executed by the Service of Fraud Repression.

The Decret of october 15th 1957 consequently of the law of august 1st, 1905 regulates the use of pectinolytic enzyms in the cider fabrication. An Order of october 15th 1957 defines the conditions of the use and selling of clearing enzyms. It compels in particular to the necessity of a previous declaration.

An Order of july 31st 1964 gives a definition of the conditions of using enzyms in the biscuit industry. The use of coagulant enzyms in cheese industry is regulated by a ministerial circular of november 26th 1967.

By the development of the industrialization and the actual commercialization of enzyms the author asks himself if the french already old reglementation will allow to control efficiently in the future the use of enzyms in the food industries.

ZUSAMMENFASSUNG

ENZYMANWENDUNG UND FRANZÖSISCHE RECHTSPRECHUNG

Die Enzymanwendung in der Landwirtschafts- und Ernährungsindustrie wird durch das Gesetz vom 1 august 1905 betreffend die Bekämpfung von Fälschungen und das Dekret vom 15 april 1912, das die vorherige Zulassung vorschreibt und ihre Kontrolle mittels einer Überwachungsstelle der Fälschungen anvertraut, geregelt.

Das Dekret vom 15 oktober 1957, folgend dem Gesetz vom 1 august 1905, reguliert die pectinolytische Enzymanwendung in der Obstmostherstellung. Eine Verordnung vom 15 oktober 1957 bestimmt die Bedingungen für die Anwendung und den Verkauf der Klärungsenzyme. Es verlangt insbesondere eine vorherige Deklarierung. Eine Verordnung vom 31 juli 1964 bestimmt die Anwendungsbedingungen der Enzyme in der Biskuitindustrie. Die Anwendung von Gerinnungsenzymen in der Käseindustrie wird durch ein ministerielles Rundschreiben vom 26 november 1967 geregelt.

Bei der gegenwärtigen Industrialisierungs- und Marktentwicklung der Enzyme fragt sich der Verfasser, ob die schon alte französiche Gesetzesregelung in der Zukunft eine wirksame Kontrolle der Enzymanwendung in den Ernährungsindustrien erlauben wird.

Ann. Technol. agric., 1972, **21** (4), 651-656.

RAPPORT GÉNÉRAL

Dr D. BERTRAND

Correspondant de l'Institut,
Membre de l'Académie d'Agriculture
Rapporteur général adjoint de la C. I. I. A.
63, Rue Notre Dame des champs, Paris 6e

L'emploi des enzymes dans les Industries agricoles et alimentaires remonte à l'aube de l'humanité puisque la production des boissons fermentées est si ancienne qu'on en ignore l'origine.

Depuis, l'emploi des enzymes dans les Industries alimentaires a pris un énorme développement, mais son usage est si courant qu'on n'y prend pas garde. D'où l'intérêt évident de cette réunion qui nous a permis de faire le point sur cette question trop méconnue.

Le fait que nous ayons eu 31 rapports et communications provenant de 13 pays et que ces séances aient été suivies par 240 auditeurs scientifiques et industriels originaires de 21 pays, suffit à prouver toute l'importance non seulement scientifique mais aussi économique du sujet que nous venons de traiter.

Dans son allocution introductive M. le Président AMMON a souligné le fait que Paris est une capitale de la Gastronomie, ce qui est un élément particulièrement favorable pour le choix de la France comme lieu de cette réunion scientifique. C'est d'ailleurs aussi en France que PAYEN et PERSOZ en 1833 découvraient la première diastase, ancien nom des enzymes : l'amylase du malt, qu'en 1857, PASTEUR démontrait que la fermentation était due à des substances biochimiques ayant une activité spécifique et qu'en 1894, Gabriel BERTRAND découvrait la première oxydase, dont nous aurons à nous occuper, avant de découvrir en 1897 la notion de co- et d'apo-enzyme généralisée plus tard par WILLSTÄTTER. Certaines boissons fermentées ne sont pas les seules à utiliser des enzymes exogènes et pour ne citer qu'un autre exemple, depuis plus de cent ans, l'emploi de papaïne ou plus exactement de produits riches en papaïne, était courant pour attendrir la viande, au moins en Amérique centrale.

Mais dans ces journées, nous ne nous sommes pas tournés vers le passé pour ne faire qu'un catalogue des emplois actuels des enzymes dans les industries agricoles et alimentaires. Au contraire, nous avons hardiment jeté nos regards vers l'avenir pour envisager l'évolution et les perspectives nouvelles de l'emploi de ces enzymes,

catalyseurs biochimiques. C'est d'ailleurs là le titre de la remarquable conférence de M. le professeur COURTOIS. Conférence qui nous a permis de survoler le problème étudié sous tous ses aspects avant d'en aborder certains détails.

La production massive d'enzymes existait déjà en France, Espagne et Japon en 1900, mais c'est surtout comme conséquence de la production importante d'antibiotiques, qu'après 1945 cette industrie s'est aussi développée pour des utilisations qui nous occupent ici :

L'utilisation des enzymes dans les industries dérivées des oses étant la plus ancienne, c'est par elle que nous avons commencé l'étude détaillée de leur emploi. MM. GUILBOT, de la GUÉRIVIÈRE et DELECOURT nous ont fait chacun un brillant exposé qui nous montre l'énorme différence existant entre l'usage néolithique où l'on se contentait, et où l'on se contente encore dans certains pays, de salive comme source d'amylase et les techniques actuelles. Techniques actuelles qui étendent en outre l'emploi des amylases à des utilisations non prévisibles autrefois : celles de la panification, de la biscuiterie et de la glucoserie. Parce que nous en comprenons les mécanismes, nous pouvons intervenir avec efficacité et prévoir l'évolution de phénomènes escomptés, ainsi que de s'en rendre maître. Nous pouvons aussi prévoir l'avenir. C'est pour mieux le saisir que M. RUTTLOFF a plus particulièrement étudié le cas de la glucoamylase dont l'utilisation industrielle est des plus prometteuses.

Mais que ce soit en biscuiterie ou dans l'industrie de la bière, certaines enzymes du cycle des oses ne sont pas les seules en jeu. Il faut en particulier faire intervenir des protéases destinées à stabiliser les produits obtenus, ceci grâce à l'élimination de certaines protéines dont l'évolution ultérieure conduirait à des composés gênants pour la conservation des produits fabriqués. Les études systématiques scientifiques et technologiques ont permis de définir l'origine et les conditions d'emploi de ces complexes enzymatiques qui dans le cas des bières permettent l'utilisation massive d'orge à la place de malt.

Les résultats obtenus en brasserie indépendamment les uns des autres par MM. HOLLÓ, WIEG et de CLERCK se complètent heureusement et sont riches en promesses pour l'avenir. Quoiqu'il ne semble pas y avoir de grosses différences organoleptiques entre les fabrications anciennes et celles du futur, il serait souhaitable d'améliorer ce point. Il s'agit d'ailleurs d'un futur très proche puisque certains pays, tel la Grande-Bretagne, utilisent déjà ces nouvelles techniques sur une très grande échelle.

En restant dans le domaine de la boisson, la digestion du lait ne pose en général pas de problèmes, mais de nombreux groupes d'individus dans divers pays du monde et beaucoup de malades ne produisent pas assez de lactase ce qui entraîne pour eux des troubles digestifs et les prive de la nutrition lactée. M. OLLING a étudié les moyens d'y remédier en opérant une digestion préalable partielle du lait grâce à une addition de lactase, addition effectuée dans des conditions bien étudiées.

De son côté, M. de KONING a éprouvé des présures d'origine microbienne, présures destinées à compléter celle d'origine animale dont la pénurie dans le monde diminue les possibilités d'extension de la fabrication des fromages. L'action des sels de calcium, en particulier, a été soigneusement étudiée. Il s'agit là d'un domaine d'avenir non encore parfaitement au point surtout en raison de la formation d'une certaine amertume. Il faudra de toute nécessité étudier les incidences organoleptiques avec l'espoir d'aboutir à des résultats comparables à ceux obtenus jusqu'ici avec la présure de

veau. C'est la raison pour laquelle MM. Rotini et Sequi ont tout spécialement étudié une présure d'origine fongique, celle d'*Endothia parasitica* qu'ils ont purifiée à partir de produits industriels courants.

Les propriétés exigées de ces préparations ont été étudiées à fond, mais les discussions ont bien mis en évidence le fait que les fabrications variées de fromages des divers pays entraînaient des propriétés différentes exigées des diverses préparations de présures animales donc aussi de celles de remplacement.

Les consommateurs de viande vivant dans un monde où on ne dispose que de peu de temps, ont tendance à délaisser de plus en plus les bas morceaux qui exigent une cuisson lente. L'utilisation d'enzymes attendrissant les viandes aurait donc un intérêt économique évident et l'on se tourne de plus en plus aux U. S. A., Canada et Grande-Bretagne, en particulier, vers l'emploi de papaïnes d'origines diverses. M. Henry nous a bien exposé cette question d'avenir, valable même pour des morceaux de premier choix en leur permettant une maturation plus rapide. Cet important progrès déjà employé en grand, n'a qu'un emploi assez limité en France pour des raisons législatives. Un complément protéinique liquide provenant de poissons dont on peut ainsi conserver une partie des propriétés, est connu depuis longtemps dans les pays asiatiques. Une fabrication moderne en continu et en grand est possible en utilisant des protéases microbiennes. C'est ce que nous a bien montré M. Cheftel. On disposerait ainsi d'une précieuse source alimentaire complémentaire pour une catégorie importante de consommateurs, ceci suivant des expériences récentes effectuées sur le Rat mais non encore admises par tous malgré l'usage asiatique.

Le cas particulier du Hareng hollandais mariné a été exposé par M. Ruiter. L'emploi de préparations de protéases, pauvres en lipases, permettent d'utiliser des harengs à n'importe quel stade de leur développement, contrairement à la fabrication traditionnelle.

Mais ce ne sont pas là les seuls cas où l'on doive se préoccuper d'améliorer les fonctionnements enzymatiques utiles à l'homme. La fabrication du chocolat pose à ce point de vue de nombreux problèmes car sa fermentation était, jusqu'il y a peu de temps, fort mal connue et difficilement contrôlable. M. Biehl qui l'a bien étudiée nous en a clairement montré les mécanismes et M. Purr nous a prouvé qu'on pouvait diriger cette fermentation par infiltration sous vide de certains facteurs, en particulier des sels de cuivre destinés à augmenter l'activité des polyphénols oxydases.

Ces dernières utilisations des enzymes posait le problème général des transformations enzymatiques dans des milieux peu hydratés. M. Drapron en a bien démontré les mécanismes et montré qu'il faut une certaine proportion d'eau solvante pour que les réactions soient suffisamment intenses. Elles ont alors une allure différente de celles réalisées en milieu riche en eau.

Lors de la conservation des aliments congelés, certaines enzymes sont bloquées dès moins 18°, température courante, tel est le cas des protéases, mais d'autres enzymes restent actives, telles les lipases. Il en résulte ainsi que nous l'a montré M. Fricker qu'on peut aboutir à des altérations du goût de certains aliments si l'on ne prend pas des précautions particulières.

Peut-on utiliser les radiations ionisantes pour bloquer les enzymes et éviter ce genre d'inconvénient et autre altération des aliments? M. Radola a étudié en détails ce point important et nous a montré que pour avoir de bons résultats, il fallait

combiner l'irradiation avec un traitement thermique, tous deux effectués dans des conditions bien déterminées.

Lors du stockage, en particulier des grains, ceux-ci se trouvent souvent imprégnés de pesticides, qu'en est-il de leur devenir ? M. MEUSER qui a étudié cette question a constaté que s'il y avait interaction possible, réversible entre enzymes et insecticides, certains insecticides pouvaient être modifiés ; d'autres ne sont pas détruits. Dans le cas des hydrocarbures chlorés qui sont très employés, il faut un stockage anaérobie pour les dégrader, par exemple le DDT passe à l'état de DDD. Si bien qu'en général il faut prendre des précautions particulières pour dégrader les résidus des pesticides.

Lors de la fabrication des jus de fruits, l'emploi de pectinases d'origine fongique permet une clarification utile et rentable. Une étude scientifique et technique poussée de cet emploi nous a été présentée par M. RZEDOWSKI, représenté par M. GOLESBIEWSKI ainsi que par M. REYMOND. Comme il peut se former au cours du traitement enzymatique de très petites quantités de méthanol, cette technique n'est pas applicable à quelques jus déjà riches en cet alcool. La glucose-oxydase permet, elle aussi d'améliorer les fabrications par la protection de l'arôme et du goût, spécialement dans le cas du jus d'orange.

Lors de ces emplois en milieu liquide on perd les enzymes. La possibilité de les fixer sur un support inerte a été étudiée en détail par MM. MONSAN et DURAND. La cinétique enzymatique est modifiée mais l'utilisation pratique n'en est pas affectée, il s'agit donc là d'une technologie d'avenir puisqu'on peut opérer en continu, mais de nombreuses études sont encore nécessaires pour la faire passer au stade industriel.

L'œnologie représente un cas spécialement intéressant pour nous, puisque lors de la fabrication du vin de nombreuses enzymes entrent en jeu. Mais avant tout l'utilisation d'enzymes exogènes pose une question de doctrine. Si on laisse de côté ce point de vue, il est possible d'utiliser avantageusement diverses enzymes d'origine fongique. C'est ce que nous a bien montré M. MARTEAU. Les pectinases ne sont pas dans ce cas dangereuses car la proportion d'estérase est assez faible, inférieure à celle existant naturellement dans les moûts alors qu'elles permettent une meilleure fabrication qu'il faut rechercher plus qu'une augmentation de rendement. On peut aussi employer des protéases et même la gluco-oxydase plus catalase pour éliminer l'excès d'oxygène lors de la mise en bouteille. Technique que Gabriel BERTRAND avait déjà essayée il y a 70 ans avec des phénolases qui accélérèrent aussi, la maturation la glucose oxydase n'étant alors que peu connue.

De leur côté, MM. TZAKOV et VELITCHKOV, dont le rapport a été lu par M. TROIEPOLSKI, ont employé avec succès lors de la fabrication de vin, des pectinases d'*Aspergillus niger* et des cellulases de *Trichoderma viridae*. Ces enzymes exogènes ont permis un plus haut rendement en moût et en qualité avec des cépages bulgares et surtout italiens.

Lors de la discussion M. ROBILLOT a souligné l'intérêt économique de ces techniques déjà très répandues dans beaucoup de pays, car il y a accélération des fabrications et obtention d'un meilleur produit.

Il est bien évident que ces diverses applications de préparations enzymatiques exogènes entraînent immédiatement une question : ces substances ne risquent-elles pas d'introduire des facteurs nuisibles ou toxiques en même temps que des facteurs utiles ?

Il est certain que la manipulation de grandes masses d'enzymes protéolytiques exige des précautions particulières, c'est en particulier ce qu'ont bien souligné le professeur FOURNIER (Paris) et le professeur ENGST (Potsdam-, Rehbrücke RDA). Ils nous ont bien exposé cet important aspect toxicologique et hygiénique. Mais lors de fabrications normalement contrôlées il n'y a pas à craindre d'incidents et jusqu'ici les mycotoxines ne sont jamais apparues dans les préparations enzymatiques. En particulier, il n'y a pas à craindre d'aflatoxines provenant d'*Aspergillus flavus* non utilisé dans les industries enzymatiques. Les contrôles permettent d'éviter des effets toxiques possibles dus à des impuretés.

Il ne restait plus qu'à envisager l'aspect législatif. La doctrine à cet égard varie beaucoup avec les pays et cette étude comparée a été magistralement exposée d'une part par M. Laurence WOOD, président du Food and Law Institute en ce qui concerne les U. S. A., et par M. NOILHAN pour la France, pays particulièrement sévère du point de vue légal.

CONCLUSION I

Il est temps de conclure. PASTEUR, déjà cité au début de ces journées par notre président le professeur AMMON, aimait à répéter qu'il n'y a aucun fossé entre la science fondamentale et les applications de celle-ci. Nous en retrouvons la preuve dans ces journées.

Tout au long de ce symposium les idées échangées ont été dominées non seulement par le fait que les enzymes sont de grosses molécules protéiniques mais aussi et surtout par des notions scientifiques relativement récentes. La première, c'est que des chaînes biochimiques sont communes à de nombreuses cellules vivantes : des bactéries aux animaux en passant par les végétaux. D'où l'idée de remplacer dans l'industrie alimentaire certaines sources traditionnelles d'enzymes par d'autres plus abondantes ou plus économiques. Mais cette notion se complique avec des découvertes récentes : les enzymes fonctionnent grâce à des échanges d'électrons π, s'effectuant au niveau d'un centre actif. On conçoit donc facilement qu'une même fonction enzymatique puisse être réalisée par des enzymes diverses. Ainsi les aldolases, enzymes se retrouvant chez tous les êtres vivants, varient dans la structure de leur centre actif : celles des bactéries sont des métallo-enzymes, alors que celles des animaux n'en sont pas. Elles varient aussi dans leur fraction apo-enzymatique non seulement dans un même type de cellule mais aussi suivant l'origine de celles-ci d'où les nombreuses *iso*-aldolases.

CONCLUSION II

On constate que même avec des enzymes pures, il puisse y avoir des variations d'activité avec le pH et des variations de spécificité vis-à-vis des substrats, ceci suivant l'origine de l'enzyme. Vous en avez eu un bel exemple avec les amylases. Celles d'origine bactérienne nécessitent la présence de calcium ce qui n'est pas le cas d'autres, et les nombreuses *iso*amylases ont des spectres d'activités très variés.

En pratique industrielle on n'utilise pas d'enzymes pures, mais des préparations plus ou moins purifiées, ce qui complique le problème technologique, on risque en particulier, d'introduire des substances gênantes ou toxiques, mais la technologie biochimique est déjà presque partout triomphante. Le législateur qui est rarement biochimiste, a souvent tendance, en voulant protéger le consommateur, à rédiger des textes qui risquent d'entraver un progrès qu'il ignore.

Rappelons à ce sujet que lorsque le professeur ANTONIANI de Milan avait proposé il y a un peu plus de quinze ans d'employer des enzymes exogènes dans les industries alimentaires, il n'avait récolté qu'un concert de protestations.

Or justement, et nous en avons la preuve, bien des faits nouveaux peuvent venir modifier des idées préconçues. Il faut donc que le législateur éclairé par les scientifiques et les industriels suive aussi ce progrès et harmonise les lois entre les divers pays qu'ils soient membres d'une même communauté ou non.

L'intérêt de ces journées consiste précisément à créer un échange de renseignements permettant d'aboutir à l'amélioration de la nutrition, à éviter les gâchis et surtout de permettre à tous de se nourrir alors que la croissance des populations dépasse déjà les possibilités nutritionnelles traditionnelles.

CONCLUSION III

L'intérêt que vous avez manifesté par votre présence exemplaire et les nombreuses interventions qui ont suivi les communications, me permet d'espérer que la Commission internationale des Industries agricoles et alimentaires qui a été l'initiatrice du *Codex alimentaire* et l'organisatrice de ce cycle des Symposiums sur les matières étrangères dans les aliments a atteint son but.